



Uniwersytet Gdański  
Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

**mgr Aleksandra Ciesielska**

**Synteza, właściwości fizykochemiczne i biologiczne  
wybranych alkiloaminowych pochodnych  
sulfonamidowych: ocena oddziaływania  
z trójwartościowymi jonami metali oraz DNA,  
właściwości przeciwutleniające i cytotoksyczność**

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych  
w dyscyplinie nauki chemiczne

Praca wykonana pod kierunkiem promotora prof. dr. hab. Mariusza Makowskiego  
oraz promotora pomocniczego dr Sandry Brzeskiej

Gdańsk 2024



## Podziękowania

Pragnę złożyć podziękowania przedstawicielom otaczającego mnie środowiska naukowego, a w szczególności:

Promotorowi, prof. dr. hab. Mariuszowi Makowskiemu, za opiekę merytoryczną, udzielone wsparcie, wartościowe dyskusje oraz pomoc w moim rozwoju naukowym.

Promotorowi pomocniczemu, dr Sandrze Brzeskiej, za pomoc, liczne rady oraz dzielenie się swoimi doświadczeniami naukowymi.

Dr. Jakubowi Brzeskiemu za wykonanie obliczeń teoretycznych oraz dokowań molekularnych, które uzupełniły przeprowadzone przeze mnie badania eksperymentalne.

Dr. hab. Dariuszowi Wyrzykowskiemu, prof. UG oraz dr Aleksandrze Tesmar z Katedry Chemii Ogólnej i Nieorganicznej Wydziału Chemii UG za pomoc w zaprojektowaniu doświadczenia oraz przeprowadzeniu badań właściwości przeciwutleniających.

Członkom Pracowni Molekularnej i Komórkowej Nefrologii, Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, Polskiej Akademii Nauk za wykonanie badań cytotoksyczności związków.

Prof. dr hab. inż. Aleksandrze Królickiej oraz mgr Magdalenie Stasiuk za przeprowadzenie badań mikrobiologicznych pochodnych sulfonamidowych.

Członkom Katedry Chemii Bionieorganicznej Wydziału Chemii UG za liczne porady, pomoc w rozwiązywaniu problemów naukowych oraz miłą atmosferę w pracy.

*W szczególności dziękuję również rodzicom i rodzinie za wsparcie oraz motywację w realizowaniu mojej ścieżki naukowej.*



## Wsparcie finansowe

Badania realizowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej były finansowane z puli środków Narodowego Centrum Nauki (NCN) projektu OPUS nr UMO-2019/33/B/ST4/00031 pt.: „*Synteza i właściwości biochemiczne pochodnych antybiotyków sulfonamidowych z analizą zmian profili bionieorganicznych wskutek kompleksowania z trójwartościowymi jonami metali (Ru, Rh, Os, Ir)*”, którego kierownikiem był prof. dr hab. Mariusz Makowski.



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Niektóre zadania badawcze zostały sfinansowane z Projektu służącemu Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Doktorantów realizowanego przez Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego oraz Projektu małych grantów – UGrants.



## Streszczenie

Zjawisko lekooporności oraz choroby nowotworowe z roku na rok stają się coraz poważniejszymi problemami, z którym boryka się współczesna medycyna. W związku z tym poszukuje się nowych farmaceutyków o szerszym spektrum aktywności biologicznej. Istnieje kilka podejść projektowania takich cząsteczek, np. na podstawie tzw. celu molekularnego, którym może być biomolekuła DNA.

Jedną z powszechnie stosowanych w medycynie grup związków są sulfonamidy, które wykazują właściwości przeciwbakteryjne. Mogą być one modyfikowane w celu zwiększenia spektrum działania. Dzięki temu związki mogą wykazywać m.in. właściwości przeciwwirusowe, przeciwzapalne, a nawet przeciwnowotworowe. Dodatkowo w wyniku występowania atomów zdolnych do przekazywania pary elektronowej w cząsteczkach sulfonamidów mogą tworzyć się połączenia koordynacyjne z biologicznie istotnymi jonami metali, co również znacząco wpływa na aktywność biologiczną farmaceutyków.

Celem niniejszej dysertacji jest określenie wpływu długości podstawnika alkiloaminowego na właściwości bakteriobójcze pochodnych sulfonamidów oraz ich zdolność przyłączania do jonów metali Ru(III) i Rh(III). Jako pochodne sulfonamidowe przebadano 4-amino-N-(2-aminoetylo)benzenosulfonamid (NethylS), 4-amino-N-(2-aminopropylo)benzenosulfonamid (NpropylS) oraz 4-amino-N-(2-aminobutylo)benzenosulfonamid (NbutylS). Jedną z możliwych ścieżek projektowania nowych preparatów jest wprowadzenie zmian w już istniejących związkach. W tym celu wykonano analizę profili elektrochemicznych pochodnych sulfonamidowych w środowisku protycznym oraz aprotycznym, co pozwala na określenie zachowania cząsteczek w układach biologicznych. Ponadto, wyznaczono właściwości kwasowo-zasadowe związków i wartości  $pK_a$ . Dzięki temu możliwe było określenie ich form protolitycznych. Zbadano również zdolność pochodnych sulfonamidowych do tworzenia połączeń koordynacyjnych z jonami Ru(III) oraz Rh(III). Dokonano oceny sposobu i siły oddziaływania analizowanych związków z helisą DNA wykorzystując technikę switchSENSE, która umożliwia określenie parametrów kinetycznych zachodzących procesów. Przeprowadzono również analizę właściwości przeciwutleniających sulfonamidów z rodnikami ABTS<sup>•+</sup> i DPPH<sup>•</sup>, dzięki czemu możliwe jest określenie zdolności związków do wychwytu

reaktywnych form tlenu (ROS). Wykonano również badanie ich cytotoksyczności oraz aktywności względem wybranych bakterii *G(+)*, *G(-)* i drożdży.

Przeprowadzone badania pozwolą na poszerzenie wiedzy dotyczącej sulfonamidów oraz zaproponowanie nowych struktur o wysokiej aktywności biologicznej.



## Abstract

The phenomenon of drug resistance and cancer are the growing problems for contemporary medicine struggles with every year. Therefore, new pharmaceuticals with a broader spectrum of biological activity are being sought. There are several approaches to designing such molecules, e.g. based on the molecular targets, which may be a DNA biomolecule.

One of the commonly used group of compounds in medicine are sulfonamides, which have antibacterial properties. They can be modified to increase the spectrum of action. In this way, compounds can exhibit antiviral, anti-inflammatory and even anticancer properties. Additionally, due to the presence of atoms capable of transferring an electron pair in sulfonamide molecules, they can coordinate with biologically important metal ions, which may also increase the biological activity of pharmaceuticals.

The aim of this dissertation is to determine the influence of the alkylamine substituent length on the bactericidal properties of sulfonamide derivatives and their ability to attach to Ru(III) and Rh(III) metal ions. The sulfonamide derivatives studied were 4-amino-N-(2-aminoethyl)benzenesulfonamide (NethylS), 4-amino-N-(2-amino-propyl)benzenesulfonamide (NpropylS) and 4-amino-N-(2-aminobutyl)benzenesulfonamide (NbutylS). One of the possible paths to designing new preparations is to introduce changes to existing compounds. For this purpose, the electrochemical profiles of sulfonamide derivatives were analyzed in protic and aprotic environments, which allows for the determination of the molecules behavior in biological systems. In addition, the acid-base properties of the compounds and  $pK_a$  values were determined. This made it possible to define their protolitic forms. The ability of sulfonamide derivatives to form coordination binders with Ru(III) and Rh(III) ions was also studied. The manner and strength of the interaction between analyzed compounds and the DNA helix was assessed using the switchSENSE technique, which allows determining of the kinetic parameters of the ongoing processes. The antioxidant properties of sulfonamides with ABTS<sup>•+</sup> and DPPH<sup>•</sup> radicals were also analyzed, that helped determine the compounds' ability to scavenge reactive oxygen species (ROS). Their cytotoxicity and activity against selected *G*(+), *G*(-) bacteria and yeasts were also studied.

The research carried out will expand knowledge about sulfonamides, which will allow the proposal of new structures with high biological activity.



## **Słowa kluczowe**

Pochodne sulfonamidowe, podstawnik alkiloaminowy, profil elektrochemiczny, właściwości kwasowo-zasadowe, właściwości kompleksotwórcze z Ru(III) i Rh(III), oddziaływania z helisą DNA, właściwości przeciwutleniające, badania cytotoksyczności, badania mikrobiologiczne

## **Keywords**

Sulfonamide derivatives, alkylamino substituent, electrochemical profile, acid-base properties, complexing properties with Ru(III) and Rh(III), interactions with the DNA helix, antioxidant properties, cytotoxicity tests, microbiological tests



**Spis treści**

Wykaz skrótów .....	15
1. Wprowadzenie .....	17
2. Cele badawcze pracy .....	35
3. Opis stosowanych metod badawczych .....	38
3.1. Synteza pochodnych sulfonamidowych .....	38
3.2. Charakterystyka strukturalna związków .....	39
3.3. Pomiary fizykochemiczne .....	39
3.3.1. Pomiary woltamperometryczne .....	39
3.3.2. Badanie właściwości kwasowo-zasadowych .....	40
3.3.3. Badanie właściwości kompleksotwórczych .....	40
3.3.4. Badanie oddziaływań z DNA przy pomocy techniki switchSENSE .....	42
3.3.5. Badanie oddziaływań z DNA przy pomocy miareczkowania spektrofotometrycznego .....	45
3.3.6. Badanie właściwości przeciwutleniających .....	46
3.4. Obliczenia teoretyczne .....	47
3.5. Badania biologiczne .....	48
3.5.1. Badanie cytotoksyczności .....	48
3.5.2. Badania mikrobiologiczne .....	49
4. Przedmiot badań oraz komentarz .....	50
4.1. [P1] What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions? .....	50
4.2. [P2] Sulfonamides differing in the alkylamino substituent length – synthesis, electrochemical characteristic, acid-base profile and complexation properties .....	52
4.3. [P3] Application of the SwitchSense Technique for the Study of Small Molecules' (Ethidium Bromide and Selected Sulfonamide Derivatives) Affinity to DNA in Real Time .....	59
4.4. [P4] Theoretical study of the alkylimino substituted sulfonamides with potential biological activity .....	68

---

4.5. [P5] Exploring the interaction of biologically active compounds with DNA using the SwitchSense technique, UV-Vis spectroscopy, and computational methods .....	74
4.6. Wyniki nieopublikowane wchodzące w skład rozprawy .....	83
4.6.1. Badanie właściwości przeciwutleniających .....	83
4.6.2. Badanie cytotoksyczności .....	84
4.6.3. Badania mikrobiologiczne .....	86
5. Podsumowanie .....	87
6. Bibliografia .....	91
Załączniki .....	112
Informacje o aktywności naukowej .....	112
Pełne wersje publikacji .....	119
[P1] What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions? .....	121
[P2] Sulfonamides differing in the alkylamino substituent length – synthesis, electrochemical characteristic, acid-base profile and complexation properties .....	144
[P3] Application of the SwitchSense Technique for the Study of Small Molecules’ (Ethidium Bromide and Selected Sulfonamide Derivatives) Affinity to DNA in Real Time .....	155
[P4] Theoretical study of the alkylamino-substituted sulfonamides with potential biological activity .....	169
[P5] Exploring the interaction of biologically active compounds with DNA using the SwitchSense technique, UV-Vis spectroscopy, and computational methods .....	177
Oświadczenia współautorów .....	189

## Wykaz skrótów

<b>ABTS<sup>+</sup></b>	Katinorodnik 2,2'-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu)
<b>AQ-NetOH</b>	1-(2-hydroksyetyloamino)-antraceno-9,10-dion
<b>ATR</b>	Spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ang. <i>attenuated total reflectance</i> )
<b>CFU</b>	Jednostki tworzące bakterie (ang. <i>colony forming units</i> )
<b>CPCM</b>	Przewodnikowy ciągły model polaryzacji solwatacji (ang. <i>conductor-like polarization continuum model</i> )
<b>CV</b>	Woltamperometria cykliczna (ang. <i>cyclic voltammetry</i> )
<b>DHF</b>	Kwas dihydrofoliowy (ang. <i>dihydrofolic acid</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i> )
<b>DNA</b>	Kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DPPH<sup>•</sup></b>	Rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu
<b>DPV</b>	Woltamperometria pulsowa różnicowa (ang. <i>differential pulse voltammetry</i> )
<b>DTI</b>	Oddziaływanie lek-cel molekularny (ang. <i>drug-target interaction</i> )
<b>EB</b>	Bromek etydyny (ang. <i>ethidium bromide</i> )
<b>EDTA</b>	Kwas etylenodiaminotetraoctowy
<b>EGTA</b>	Kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N' tetraoctowy
<b>EIS</b>	Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (ang. <i>electrochemical impedance spectroscopy</i> )
<b>FBO</b>	Rozmyty rząd wiązania (ang. <i>Fuzzy Bond Order</i> )
<b>FDA</b>	Agencja ds. Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>FTIR</b>	Spektroskopia Fouriera w podczerwieni (ang. <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> )
<b>G(+)</b>	Bakterie Gram-dodatnie (ang. <i>Gram-positive bacteria</i> )
<b>G(-)</b>	Bakterie Gram-ujemne (ang. <i>Gram-negative bacteria</i> )
<b>GCE</b>	Elektroda z węgla szklistego (ang. <i>glassy carbon electrode</i> )
<b>HDAC</b>	Deacetylaza histonowa (ang. <i>histone deacetylase</i> )
<b>K<sub>A</sub></b>	Stała asocjacji (ang. <i>association constant</i> )
<b>k<sub>a</sub></b>	Współczynniki szybkości asocjacji (ang. <i>association rate</i> )
<b>K<sub>D</sub></b>	Stała dysocjacji (ang. <i>dissociation constant</i> )
<b>k<sub>d</sub></b>	Współczynniki szybkości dysocjacji (ang. <i>dissociation rate</i> )
<b>LOD</b>	Granica wykrywalności (ang. <i>limit of detection</i> )
<b>LOQ</b>	Granica oznaczalności (ang. <i>limit of quantification</i> )
<b>MBC</b>	Najmniejsze stężenie bakteriobójcze (ang. <i>minimal bactericidal activity</i> )
<b>MD</b>	Dynamika molekularna (ang. <i>Molecular Dynamics</i> )
<b>MDR-TB</b>	Gruźlica wielolekooporna (ang. <i>multi-drug resistant tuberculosis</i> )
<b>MIC</b>	Najmniejsze stężenie hamujące (ang. <i>minimal inhibitory concentration</i> )
<b>MS</b>	Spektrometria mas (ang. <i>mass spectrometry</i> )
<b>NAB</b>	Budulec kwasu nukleinowego (ang. <i>Nucleic Acid Builder</i> )
<b>NbutylS</b>	4-amino-N-(2-aminobutyl) benzenosulfonamid
<b>NET</b>	Netropsyna (ang. <i>netropsin</i> )
<b>NethylS</b>	4-amino-N-(2-aminoetyl)benzenosulfonamid
<b>NhexylS</b>	4-amino-N-(2-aminoheksylo)benzenosulfonamid
<b>NMR</b>	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i> )
<b>NpentylS</b>	4-amino-N-(2-aminopentyl)benzenosulfonamid
<b>NpropylS</b>	4-amino-N-(2-aminopropyl)benzenosulfonamid

---

<b>OD</b>	Gęstość optyczna (ang. <i>optical density</i> )
<b>PABA</b>	Kwas <i>p</i> -aminobenzoowy (ang. <i>p-aminobenzoic acid</i> )
<b>PTCA</b>	Pirazyno-2-tiokarboksyamid
<b>ROS</b>	Reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i> )
<b>SAR</b>	Zależność struktura-aktywność (ang. <i>structure activity relationship</i> )
<b>SCP</b>	Sulfachloropirydazyna (ang. <i>sulfamethoxy pyridazine</i> )
<b>SCRf</b>	Samouzgodnione pole reakcji (ang. <i>Self-Consistent Reaction Field</i> )
<b>SDM</b>	Sulfadimetoksyna (ang. <i>sulfadimethoxine</i> )
<b>SDZ</b>	Sulfadiazyna (ang. <i>sulfadiazine</i> )
<b>SGD</b>	Sulfaguanidyna (ang. <i>sulfaguanidine</i> )
<b>SIZ</b>	Sulfizoksazol (ang. <i>sulfisoxazole</i> )
<b>SMD</b>	Model gęstości rozpuszczalnika (ang. <i>Solvation Model Density</i> )
<b>SMP</b>	Sulfametoksyropydazyna (ang. <i>sulfamethoxy pyridazine</i> )
<b>SMR</b>	Sulfamerazyna (ang. <i>sulfamerazine</i> )
<b>SMT</b>	Sulfametazyna (ang. <i>sulfamethazine</i> )
<b>SMX</b>	Sulfametoksazol (ang. <i>sulfamethoxazole</i> )
<b>SPR</b>	Powierzchniowy rezonans plazmonowy (ang. <i>surface plasmon resonance</i> )
<b>SPY</b>	Sulfapirydyna (ang. <i>sulfapyridine</i> )
<b>STAT</b>	Przebieg sygnału i aktywator transkrypcji (ang. <i>signal transduction and activator of transcription</i> )
<b>STZ</b>	Sulfatiazol (ang. <i>sulfathiazole</i> )
<b>SWV</b>	Woltamperometria fali prostokątnej (ang. <i>square wave voltammetry</i> )
<b>TBAP</b>	Nadchloran tetrabutylamonowy (ang. <i>tetrabutylammonium perchlorate</i> )
<b>THF</b>	Kwas tetrahydrofoliowy (ang. <i>tetrahydrofolic acid</i> )
<b>TLC</b>	Chromatografia cienkowarstwowa (ang. <i>thin-layer chromatography</i> )

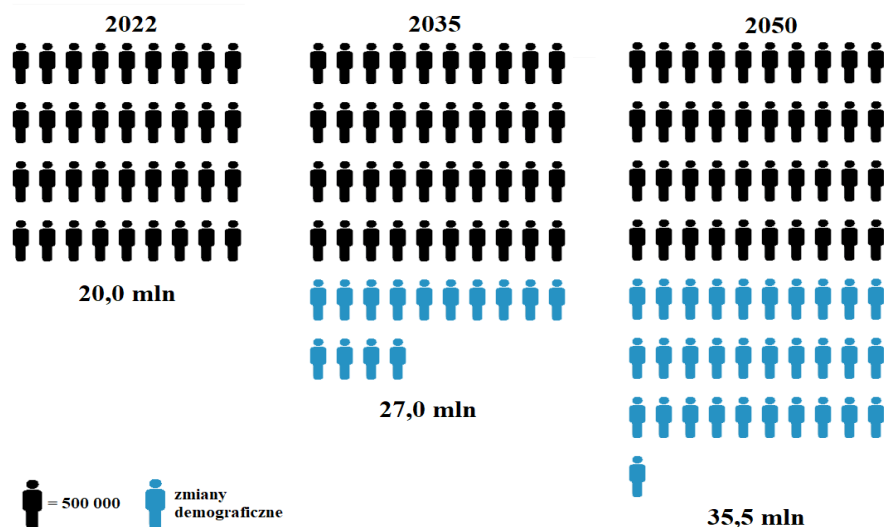
---



## 1. Wprowadzenie

Obecnie, jako społeczeństwo, coraz częściej zmagamy się z problemem lekooporności. Każdego roku ponad 700 000 osób umiera z powodu oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe [1]. Szacuje się także, że do 2050 roku liczba ta wzrośnie do 10 milionów zgonów [2]. Zjawisko to jest wywołane ciągłą ewolucją bakterii, wirusów, grzybów oraz pasożytów, w wyniku której drobnoustroje nieustannie dostosowują się do nowych czynników środowiskowych i stają się odporne na stosowane terapie. Lekooporność może rozwijać się na drodze doboru naturalnego, działającego na podstawie przypadkowych mutacji [3]. Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe wynika ze zmian genetycznych, odporne szczepy bakterii można znaleźć w dowolnym miejscu na świecie. Pochodzą one z różnych źródeł, np. od ludzi, zwierząt, roślin, wody i gleby [4]. Problem lekooporności jest wywołany m.in. niewłaściwym lub nadmiernym stosowaniem farmaceutyków, jak i również powszechnym wykorzystywaniem antybiotyków w produkcji żywności [5]. Do typowych przykładów zakażeń lekoopornych zalicza się odporny na metycylinę *Staphylococcus aureus* [6–8], gruźlicę wielolekooporną (MDR-TB) [9–11] oraz lekooporne szczepy malarii [12–14] i HIV [15,16].

Kolejnym zagrożeniem, które ma wpływ na dużą liczbę zgonów w populacji ludzkiej są choroby nowotworowe. Według badania GLOBOCAN 2020 opracowanego przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem, w 2020 roku na całym świecie odnotowano 19,3 mln nowych przypadków nowotworów i prawie 10,0 mln zgonów z powodu tych chorób [17]. Ponadto szacuje się, że w 2050 r. globalne obciążenie chorobami nowotworowymi osiągnie 35,3 mln przypadków, co oznacza wzrost o około 53% w stosunku do roku 2022, w którym odnotowano ich 20 mln (*Rysunek 1*) [18]. Choroby nowotworowe stanowią jedną z głównych przyczyn zachorowań i zgonów na całym globie, niezależnie od stopnia rozwoju cywilizacyjnego w danym rejonie świata [19,20].



**Rysunek 1.** Schemat zachorowalności opracowany na podstawie danych uzyskanych przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (na podstawie danych z literatury [18]).

Zjawisko lekooporności i wysoka zachorowalność na nowotwory są zagrożeniem dla ludzkości, które może doprowadzić do kryzysu współczesnej medycyny. Dlatego konieczne jest opracowanie nowych strategii i podejść, aby przezwyciężyć problem rosnącej oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe [5,21]. W tym celu poszukuje się nowych związków o aktywności biologicznej, ale także modyfikuje się struktury układów o udowodnionym działaniu farmakologicznym w celu zwiększenia ich skuteczności działania [22–24]. Przykładem takich modyfikacji może być wiązanie biologicznie aktywnych ligandów z jonami metali w związki kompleksowe [25].

Proces projektowania nowego leku jest skomplikowany i polega na doborze odpowiednich właściwości związku w zależności od jego miejsca działania i drogi podania oraz ustaleniu zależności struktura-aktywność (SAR) [26]. Procedura ta jest czasochłonna i bardzo kosztowna. Szacuje się, że wprowadzenie leku „od pomysłu” do wdrożenia zajmuje około 18 lat i kosztuje ponad 2 mld dolarów [27]. W trakcie projektowania farmaceutyków, szczególną uwagę zwraca się na strukturę, wielkość cząstek i stabilność substancji chemicznych, czynników biologicznych i produktów metabolitów. Pod uwagę należy brać także hydrofilowo-lipofilowy charakter związku, jego rozpuszczalność, właściwości kwasowo-zasadowe, stopień jonizacji, trwałość termiczną, aktywność i cytotoksyczność. Transport cząsteczki z miejsca podania do miejsca działania jest złożony i związany ze sposobem podania leku, a tym samym z różnym środowiskiem chemicznym poszczególnych etapów drogi farmaceutyku

do zakładanego miejsca w organizmie. Najpopularniejszą drogą podawania jest droga doustna, która jest być może najtrudniejszą, ze względu na różne środowiska chemiczne (występujące w żołądku, jelitach, czy dwunastnicy) i bariery fizjologiczne na drodze leku. Natomiast niezależnie od wybranej metody dostarczania preparatu cząsteczka powinna być rozpuszczalna w wodzie. Dzięki temu składniki aktywne docierają do zamierzonych miejsc, takich jak przewód pokarmowy, osocze krwi, czy płyn opłucny i osiągają pożądany efekt terapeutyczny. W środowisku wodnym związki polarne są łatwo wydalane przez nerki, ale mogą mieć problem z przenikaniem przez barierę błon lipidowych. Związki lipofilowe z kolei mają trudności z przenikaniem do krwi, a jeśli już się tam dostaną, często są wchłaniane przez komórki tłuszczowe. Podsumowując, prototypowa cząsteczka leku, która ma większe szanse dotarcia do porządanego miejsca, będzie charakteryzować się rozpuszczalnością, umiarkowaną lipofilowością oraz wystarczającymi cechami strukturalnymi, aby skutecznie oddziaływać na określony cel molekularny. Dzięki temu nie dochodzi do nadmiernego zakłócania funkcji innych napotykaných cząsteczek i makrocząsteczek [28,29].

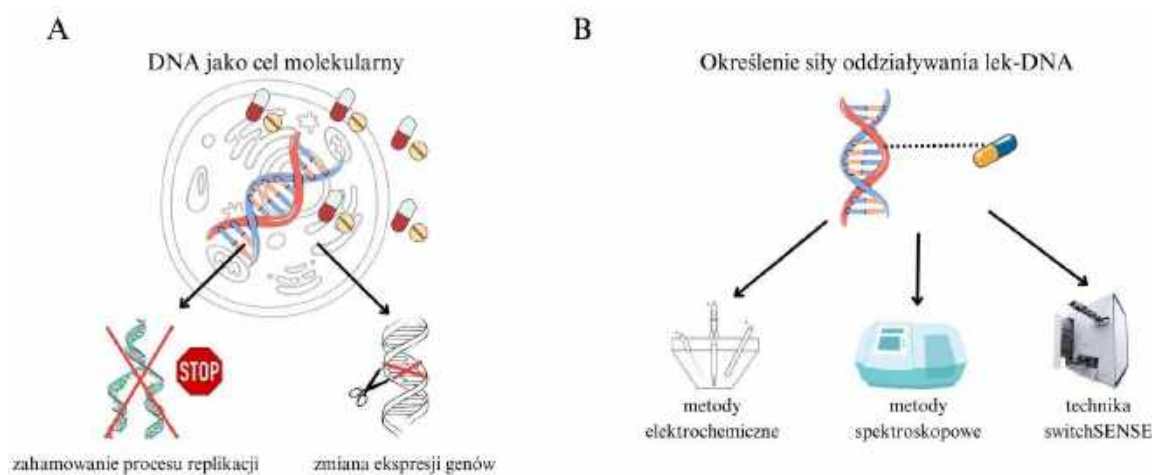
Jedną ze strategii w poszukiwaniu nowych farmaceutyków jest projektowanie leków na podstawie tzw. celu molekularnego [30,31], którym jest istotna biologicznie cząsteczka zaangażowana w szlaki sygnałowe lub metaboliczne specyficzne dla danej choroby [32]. Celami molekularnymi są białka [33,34], enzymy [35,36], receptory [37,38] i inne znaczące z punktu funkcjonowania organizmu składniki komórkowe zaangażowane w szlaki metaboliczne lub procesy fizjologiczne [39–42]. W kontekście projektowania leków istotne jest określenie zależności pomiędzy lekiem, jego celem, a zintegrowaną z nimi chorobą. W związku z tym, konieczne jest zbadanie profilu farmakologicznego leku, pod kątem występowania pożądanych oraz niepożądanych efektów terapeutycznych. Ponadto, identyfikacja oddziaływania lek-cel molekularny (DTI) jest niezbędna w projektowaniu nowych preparatów, co może pomóc w maksymalizacji efektów terapeutycznych przy jednoczesnej minimalizacji efektów ubocznych. Niestety w wielu przypadkach eksperymentalne określenie zależności pomiędzy farmaceutykiem, a celem jest kosztowne i czasochłonne co sprawia, że podejście *in silico* lub metody obliczeniowe są niezbędne do przyspieszenia opracowywania struktury leków [43].

Celem molekularnym może być również biomolekuła DNA [44,45], która odpowiada za przenoszenie informacji genetycznej w organizmach żywych.

Leki skierowane na helisę DNA mogą bezpośrednio wiązać się z nią, powodując zahamowanie procesu replikacji i naprawy. Ponadto, takie farmaceutyki mogą działać na określone sekwencje DNA doprowadzając do zmiany ekspresji genów lub korygowania defektów genetycznych (**Rysunek 2A**) [46,47]. Ze względu na sposób oddziaływania związków chemicznych z DNA można wyróżnić: interkalację, wiązanie w małym lub dużym rowku helisy, niespecyficzne wiązanie na zewnątrz nici oraz alkilowanie DNA. W dużym uproszczeniu, interkalacja cząsteczek do DNA opiera się na występowaniu oddziaływań niekowalencyjnych z kwasem deoksyrybonukleinowym. Polega ona na wnikanii heterocyklicznych lub aromatycznych układów pomiędzy pary zasad w helisie DNA. Oddziaływanie w rowkach natomiast charakteryzuje się powstawaniem głównie wiązań wodorowych pomiędzy grupami funkcyjnymi związku, a zasadami nukleinowymi. Niespecyficzne wiązanie na zewnątrz nici DNA odbywa się poprzez oddziaływanie z elektrostatycznie ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi biomolekuły. W tym przypadku, związki nie wnikają do struktury DNA ze względu na występowanie zawady sterycznej. Alkilowanie helisy DNA natomiast polega na tworzeniu wiązań kowalencyjnych. Cząsteczka stanowi elektrofili, który reaguje z nukleofilowymi centrami DNA, takimi jak atomy azotu lub tlenu. Wiązanie to może zachodzić zgodnie z mechanizmami substytucji nukleofilowej  $S_N1$  lub  $S_N2$  [48–51].

Warto również zaznaczyć, że kluczowe jest określenie siły oddziaływania lek-DNA, a co za tym idzie, identyfikacja sposobu działania danego związku. W tym celu przeprowadzane są badania *in vivo* na żywych komórkach [52,53]. Jednak ze względu na czasochłonność i wysokie koszty analiz, w początkowych etapach projektowania leku, można zastosować tańsze metody instrumentalne, takie jak techniki spektroskopowe i elektrochemiczne (**Rysunek 2B**). Za ich pomocą, można wyznaczyć wartość stałej oddziaływania ( $K$ ) pomiędzy związkiem, a biomolekułą DNA w roztworze. Obie wyżej wymienione metody opierają się na analizie sygnałów samej cząsteczki i powstałego adduktu lek-DNA, na podstawie których wylicza się stałą wiązania. W technice spektroskopowej mierzonym sygnałem jest absorbanca, natomiast w woltamperometrii – odpowiedź prądowa układu [54–57]. Metody te posiadają jednak pewne ograniczenia. Nie umożliwiają one określenia szybkości reakcji wiązania oraz nie dostarczają bezpośredniej informacji o procesie dysocjacji adduktu lek-DNA. Alternatywą dla omawianych metod jest technika switchSENSE, która pozwala na wyznaczenie kinetyki

zachodzących procesów. Umożliwia ona wyznaczenie stałych asocjacji ( $K_A$ ) i dysocjacji ( $K_D$ ) zachodzącej reakcji oraz ich szybkości w czasie rzeczywistym. Technika ta wykorzystuje chipy pokryte cienką warstwą złota z zakotwiczonymi fragmentami nici kwasu nukleinowego, które po procesie funkcjonalizacji, przyłączają do siebie nici DNA z tzw. układem sygnalizacyjnym. Dzięki niemu, otrzymujemy informację o zachodzących oddziaływaniach, na podstawie zmian natężenia fluorescencji układu [58–62].



**Rysunek 2.** Schemat przedstawiający **A.** wpływ farmaceutyków na helisę DNA oraz **B.** techniki umożliwiające określenie siły oddziaływań pomiędzy DNA, a badaną cząsteczką.

Jedną z powszechnie stosowanych w medycynie grup związków są antybiotyki. Pierwotnie definiowano je jako substancje, które są wytwarzane przez mikroorganizmy w celu zahamowania rozwoju innych drobnoustrojów. W związku z tym, słowo antybiotyk pochodzi od greckiego słowa „*anitibiosis*”, co oznacza „przeciw życiu” [63]. Pierwszy antybiotyk, penicilinę, odkrył bakteriolog Alexander Fleming w 1928 roku. Zauważył on, że na agarowej płytce z kulturami gronkowców, rozwinął się szczep pleśni *Penicillium notatum*, który spowodował zahamowanie rozwoju bakterii. Naukowiec wyizolował substancję czynną z grzyba i odkrył, że posiada ona właściwości antibakteryjne przeciw patogenom *Gram-dodatnim G(+)* [64–66].

Obecnie antybiotyki, podobnie jak chemioterapeutyki, definiuje się jako substancje chemiczne, które wprowadzone do organizmów żywych wywołują efekt biologiczny. Należy jednak pamiętać, że chemioterapeutyki są wynalezione przez człowieka i nie posiadają naturalnego pierwowzoru [67,68]. Do omawianych związków przeciwdrobnoustrojowych należą środki naturalne, bądź produkowane częściowo

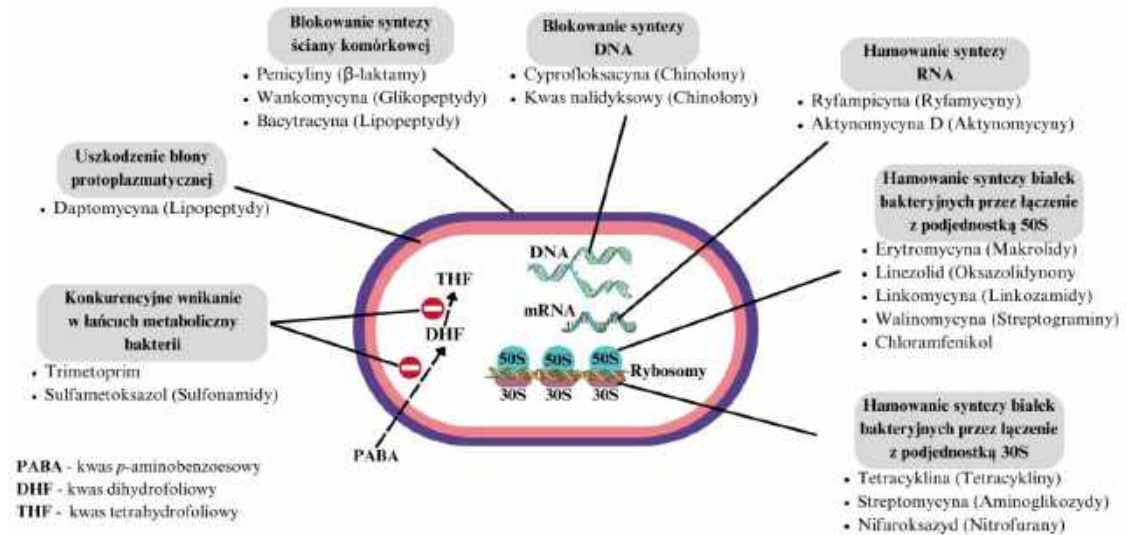
(półsyntetyczne) lub całkowicie (syntetyczne) przy użyciu technik syntetycznych [69]. Wyróżnia się dwie główne ścieżki ich działania: działanie bakteriobójcze, powodujące śmierć kolonii bakterii oraz bakteriostatyczne, hamujące wzrost i namnażanie patogenów [67,70]. Miarą aktywności antybiotyków są wartości MBC (najmniejsze stężenie bakteriobójcze, ang. *minimal bactericidal activity*) oraz MIC (najmniejsze stężenie hamujące, ang. *minimal inhibitory concentration*) wyrażone w jednostce mg/l lub µg/ml [71]. Antybiotyki mogą posiadać aktywność przeciw bakteriom *Gram-dodatnim* (*G+*), *Gram-ujemnym* (*G-*), jak i również mogą być stosowane przy zakażeniach mykoplazmatycznych. Bakterie *G(+)* posiadają grubą, wielowarstwową sieć mureiny z obecnymi kwasami tejchojowymi oraz są pozbawione błony zewnętrznej. W przypadku bakterii *G(-)* warstwa mureiny jest cienka, kwasy tejchojowe nie są w niej obecne, ale posiadają one błonę zewnętrzną, zbudowaną z fosfolipidów, białek oraz liposacharydów. Mykoplazmy są najmniejszymi bakteriami, które wielkością przypominają wirusy oraz nie posiadają błony komórkowej. Bakterie stają się odporne na stosowane antybiotyki. Można wyróżnić dwa rodzaje oporności: naturalna, która jest cechą stałą występującą u wszystkich szczepów danego gatunku oraz nabyta, czyli wykształcona w trakcie życia drobnoustroju w odpowiedzi na stosowanie farmaceutyku [69].

Antybiotyki można klasyfikować na kilka sposobów, takich jak np. struktura molekularna, spektrum i sposób działania. Klasy antybiotyków na podstawie ich cząsteczki lub struktury chemicznej obejmują m.in. β-laktamy, tetracykliny, makrolidy, chinolony, sulfonamidy, aminoglikozydy, oksazolidynony, glikopeptydy, linkozamidy, streptograminy, lipopeptydy, aktynomycyny, ryfamycyny i nitrofurany [70,72,73]. Ponadto są one skierowane na różne cele molekularne (**Rysunek 3**). W związku z czym wyróżniamy następujące mechanizmy działania antybiotyków:

- zakłócanie funkcji błony cytoplazmatycznej;
- hamowanie syntezy ściany komórkowej, rozpad struktury lub funkcji błony komórkowej;
- blokowanie biosyntezy prekursorów kwasów nukleinowych (nukleotydów purynowych lub pirymidynowych);
- hamowanie syntezy białek wynikające z blokowania funkcji rybosomalnych poprzez łączenie z podjednostką 50S lub 30S;
- hamowanie kluczowych procesów metabolicznych;
- zakłócanie i hamowanie procesu replikacji DNA;

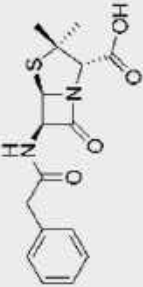
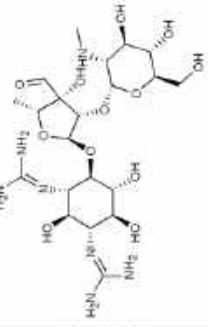
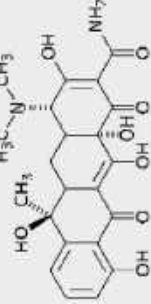
- hamowanie działania określonych enzymów (np. topoiizomerazy II);
- inhibicja syntezy RNA, poprzez hamowanie aktywności polimerazy RNA;
- blokowanie matrycy DNA [63,69].

Najbardziej popularne klasy antybiotyków wraz z opisem charakterystycznych elementów ich budowy, mechanizmem działania oraz przykładami zebrano w **Tabeli 1**.

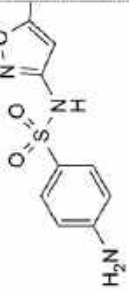
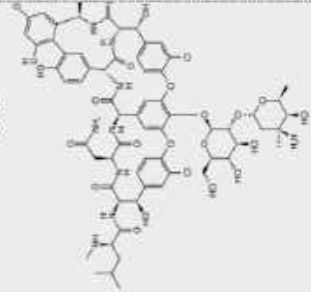
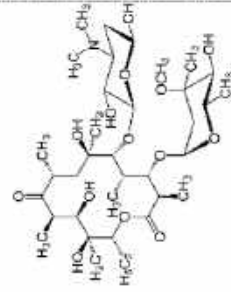


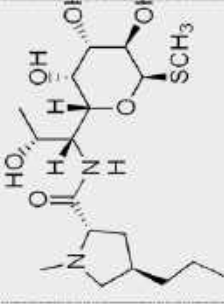
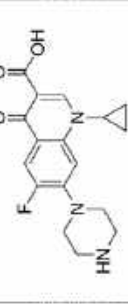
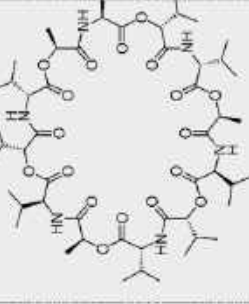
**Rysunek 3.** Schemat przedstawiający cele molekularne antybiotyków oraz ich przykłady (na podstawie literatury [72]).

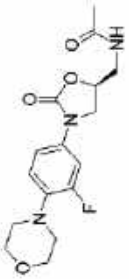


Tabela 1. Zbiór wybranych informacji dla przykładowych klas antybiotyków [69,70,72-74].

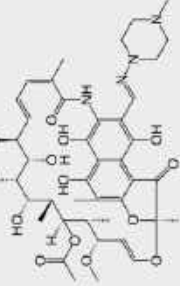
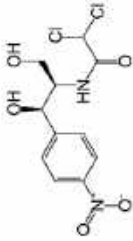

Klasa antybiotyków	Budowa cząsteczki	Przykład antybiotyku	Mechanizm działania	Efekt przeciwbakteryjny	Działanie na bakterie	Literatura
<b><math>\beta</math>-laktamy</b>	Zawierają pierścień $\beta$ -laktamowy	Benzylpenicylina (Penicilina G) 	Inhibicja biosyntezy ściany komórkowej	bakteriobójczy	G(+)	[69,70,72,73]
<b>Aminoglikozydy</b>	Zawierają reszty aminocukrowe	Streptomycyna 	Blokowanie syntezy białek bakteryjnych przez łączenie z podjednostką 30S	bakteriobójczy	G(+), G(-)	[69,70,72,73]
<b>Tetracykliny</b>	Zawierają cztery pierścienie węglowodanowe	Tetracyklina 	Blokowanie syntezy białek bakteryjnych przez łączenie z podjednostką 30S	bakteriostatyczny	G(+), G(-), Mykoplazma	[69,70,72,73]



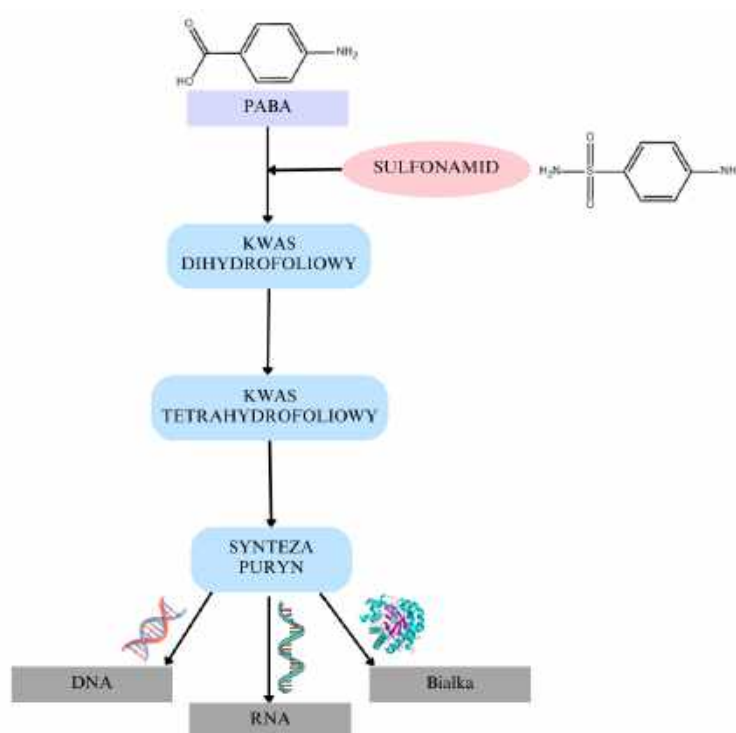
<b>Sulfonamidy</b>	Zawierają grupę sulfonamidową	Sulfametoksazol 	Konkurencyjne wnikanie w łańcuch metaboliczny bakterii	bakteriostatyczny	$G(+)$ , $G(-)$	[70,72]
<b>Glikopeptydy</b>	Zawierają peptyd połączony z węglowodorem	Wankomycyna 	Inhibicja biosyntezy ściany komórkowej	bakteriobójczy	$G(+)$	[69,70,72,73]
<b>Makrolidy</b>	Zawierają 12-16 węglowy rdzeń laktonowy	Erytromycyna 	Blokowanie syntezy białek bakterieryjnych przez łączenie z podjednostką 50S	bakteriostatyczny	$G(+)$ , $G(-)$ , Mykoplazma	[69,70,72,73]

<p><b>Linkozamidy</b></p>	<p>Są pochodnymi metylotiolinkozaminy i kwasu propylohydronowego</p>	<p>Linkomycyna</p> 	<p>Blokowanie syntezy białek bakteryjnych przez łączenie z podjednostką 50S</p>	<p>bakteriostatyczny</p>	<p><i>G</i>(+), <i>G</i>(-)</p>	<p>[73]</p>
<p><b>Chinolony</b></p>	<p>Pochodne kwasu nalidoksoowego</p>	<p>Cyprofloksacyna</p> 	<p>Inhibicja syntezy DNA</p>	<p>bakteriobójczy</p>	<p><i>G</i>(+), <i>G</i>(-)</p>	<p>[70,72,73]</p>
<p><b>Streptograminy</b></p>	<p>Są zbudowane z dwóch odrębnych związków chemicznych z grup makrolaktonów, zawierających liczne wiązania nienasycone oraz cyklicznych heksadepsipeptydów</p>	<p>Walinomycyna</p> 	<p>Blokowanie syntezy białek bakteryjnych przez łączenie z podjednostką 50S</p>	<p>bakteriobójczy</p>	<p><i>G</i>(+), <i>G</i>(-), Mykoplazma</p>	<p>[69,73]</p>

<b>Oksazolidynony</b>	Zawierają szkielet 1,3-oksazolidyn-2-onu		Blokowanie syntezy białek bakteryjnych przez łączenie z podjednostką 50S	bakteriostatyczne	$G(+)$	[70,72,73]
<b>Lipopeptydy</b>	Zawierają cykliczną lub liniową część peptydową oraz kowalencyjnie przyłączone do niej łańcuch lipidowy		Zaburzenie biosyntezy ściany komórkowej	bakteriobójcze	$G(+)$ , $G(-)$	[73]
<b>Aktynomycyny</b>	Zawierają heterotrójcykliczny układ chromoforowy nazywany pierścieniem fenoksazonowym		Hamowanie syntezy RNA poprzez blokowanie matrycy DNA	Bakteriobójcze oraz bakteriostatyczne w zależności od pochodnej	$G(+)$ , $G(-)$	[74]

<b>Ryfamicyny</b>	Zawierają układ aromatyczny o płaskiej budowie spięty mostkiem alifatycznym	Ryfampicyna 	Hamowanie aktywności polimerazy RNA	Bakteriobójcze	$G(+)$ , $G(-)$	[69]
<b>Chloramfenikol</b>	Aromatyczny związek nitrowy o charakterze wodoru dwuwodorotlenowego (w farmacji stosuje się jego estry, które są prolekami)	Chloramfenikol 	Blokowanie syntezy białek bakteryjnych przez łączenie z podjednostką 50S	Bakteriostatyczny	$G(+)$ , $G(-)$ , Mykoplazma	[70]
<b>Nitrofurany</b>	Heterocykliczne pochodne furanów	Nifuroksazyd 	Blokowanie syntezy białek bakteryjnych przez łączenie z podjednostką 30S	Bakteriobójcze	$G(+)$ , $G(-)$	[72]

Jedną z powszechnie stosowanych grup związków o charakterze bakteriobójczym są sulfonamidy. Pierwszym odkrytym związkiem należącym do tej grupy jest sulfanilamid, substancja aktywna Prontosilu. W 1935 roku, niemiecki patolog i bakteriolog – Gerhard Domagk zauważył aktywność bakteriologiczną tej substancji, a już po dwóch latach został on wprowadzony na rynek jako środek przeciwdrobnoustrojowy [66,75]. Obecnie sulfonamidy definiowane są jako związki siarkoorganiczne posiadające grupę sulfonamidową  $-SO_2NH-$  bezpośrednio przyłączonej do pierścienia aromatycznego oraz podstawnik  $-NH_2$  w pozycji N4 [76]. Charakteryzują się one szerokim spektrum działania przeciwko bakteriom  $G(+)$  oraz  $G(-)$  takim jak m.in. *Nocardia*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Chlamydia trachomatis* oraz niektórym pierwotniakom [72]. Mogą być stosowane w leczeniu m.in. zapalenia migdałków, posocznicy, meningokokowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, czerwonki prątkowej i w wielu infekcjach dróg moczowych [77]. Sulfonamidy są strukturalnymi analogami kwasu *p*-aminobenzoowego (PABA), dzięki czemu mechanizm ich działania opiera się na konkurencji obu powyżej wymienionych związków w szlaku prowadzącym do syntezy kwasów nukleinowych. W konsekwencji preparaty te powodują zahamowanie wzrostu komórek [77,78]. Schemat działania sulfonamidów przedstawiono na **Rysunku 4**.



**Rysunek 4.** Schemat przedstawiający mechanizm działania sulfonamidów.

Wśród sulfonamidów stosowanych obecnie w medycynie oraz weterynarii można wyróżnić m.in. sulfaguanidynę (SGD), sulfapirydynę (SPY), sulfadiazynę (SDZ), sulfametoksazol (SMX), sulfatiazol (STZ), sulfamerazynę (SMR), sulfizoksazol (SIZ), sulfametazynę (SMT), sulfametoksypirydazynę (SMP), sulfachloropirydazynę (SCP) i sulfadimetoksynę (SDM) [79–81].

Obecność grupy sulfonamidowej w strukturze antybiotyku może powodować tworzenie sieci wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami. Takie same układy tworzą grupy karboksylowe, w związku z tym, sulfonamidy mogą być stosowane jako ich skuteczne bioizostery. Dzięki temu antybiotyki te mogą być modyfikowane w celu uniknięcia negatywnych właściwości grupy karboksylowej, takich jak toksyczność, niestabilność metaboliczna, czy ograniczona bierna dyfuzja przez błony biologiczne. W konsekwencji, występowanie ugrupowań sulfonamidowych cieszy się dużą popularnością w projektowaniu leków, a ich modyfikacje mogą zwiększać aktywność biologiczną [82]. Takie pochodne sulfonamidowe znajdują szerokie spektrum zastosowań w medycynie, farmakologii oraz farmacji, gdzie są stosowane jako środki przeciwbakteryjne [83–85], przeciwwirusowe [86], przeciwgrzybicze [83,87], przeciwzapalne [88,89], inhibitory proteaz [90,91], leki przeciwcukrzycowe [92,93] i przeciwnowotworowe [94,95]. Te ostatnie zostały zatwierdzone przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) i są stosowane w terapiach nowotworowych. Przykładem takiego związku jest Belinostat, czyli inhibitor deacetylazy histonowej (HDAC), stosowany w leczeniu chłoniaka z obwodowych komórek limfocytów T [82,95,96]. Innym przykładem zatwierdzonego leku sulfonamidowego jest amsakryna – inhibitor topoisomerazy II. Jest ona stosowana do leczenia ostrych białaczek i chłoniaków, a zasada jej działania opiera się na interkalacji DNA komórek nowotworowych [82,97,98].

Sulfonamidy i ich pochodne w swojej strukturze posiadają atomy donorowe (tlenu, siarki i azotu), co umożliwia im tworzenie połączeń koordynacyjnych z jonami metali. Właściwość ta jest często wykorzystywana przy projektowaniu nowych farmaceutyków, ponieważ umożliwia syntezę związków kompleksowych o znanym działaniu z biologicznie ważnymi jonami metali. Takie zabiegi wykazały wzrost aktywności biologicznej związku koordynacyjnego w porównaniu z wolnym ligandem [25,99]. Obecnie poszukuje się biologicznie aktywnych kompleksów metali przejściowych jako alternatywnych klas leków chemioterapeutycznych, które działają samodzielnie lub

w schematach skojarzonych, blokując niepożądaną proliferację komórek nowotworowych.

Prawidłowe funkcjonowanie każdego organizmu jest możliwe dzięki obecności odpowiednich ilości jonów metali, a ich brak lub nadmiar może powodować choroby, kancerogenezę lub śmierć. Mogą one uczestniczyć w wielu reakcjach biochemicznych. Jony metali są odpowiedzialne m.in. za utrzymanie ładunków elektrycznych i ciśnienia osmotycznego, ułożenie i stabilność zasad nukleinowych oraz transkrypcję DNA. Przyczyniają się także do prawidłowego funkcjonowania komórek nerwowych, mięśniowych, mózgu i serca oraz transportu tlenu. Metalami niezbędnymi do prawidłowego funkcjonowania organizmu są m.in. sód (Na), potas (K), magnez (Mg), wapń (Ca), wanad (V), chrom (Cr), mangan (Mn), żelazo (Fe), kobalt (Co), nikiel (Ni), miedź (Cu), cynk (Zn), molibden (Mo) i kadm (Cd) [100–102]. W komórkach jony metali występują głównie w postaci związków koordynacyjnych, na przykład atomem centralnym chlorofilu A jest jon  $Mg^{2+}$ , witaminy B12 –  $Co^+$ , a hemu –  $Fe^{2+}$ .

Jony metali znajdują także zastosowanie w medycynie przy projektowaniu nowych substancji aktywnych leków. Obecnie w farmaceutyce coraz częściej wykorzystywane są związki koordynacyjne. Niektóre kompleksy  $Fe(III/II)$ ,  $Co(III)$  i  $Cu(II)$  posiadają właściwości przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe [103–106]. Związki zawierające w swojej strukturze  $Pd(II)$  mogą być wykorzystywane w leczeniu HIV, zakażeń mikrobami oraz białaczek [107–109]. Związki kompleksowe  $Pt(IV/II)$ ,  $Ru(III/II)$ ,  $Rh(III/II)$ ,  $Os(III/II)$  i  $Au(III/I)$  wykazują właściwości przeciwnowotworowe [110–112], a cząsteczki zawierające  $Ir(III)$  mogą być stosowane jako radioizotopy [113]. Jednym ze związków koordynacyjnych, zaakceptowanym przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) jest auranofina stosowana przy leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, posiadająca  $Au(III)$  jako atom centralny [114]. Przykłady takich połączeń można by mnożyć.

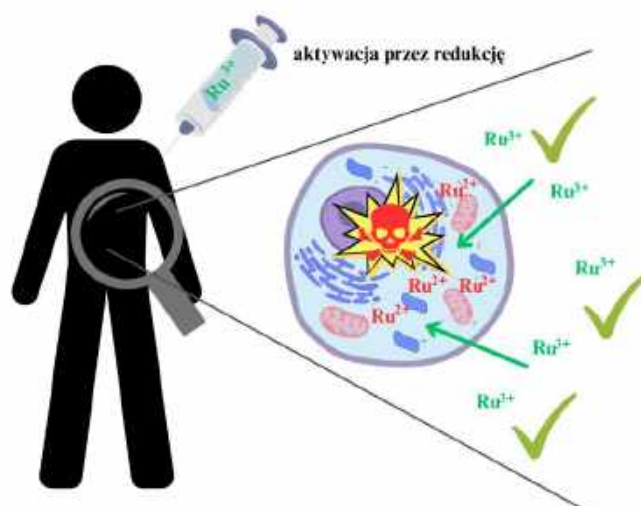
Innym, popularnym związkiem koordynacyjnym stosowanym w medycynie jest cisplatyna oraz jej analogi drugiej i trzeciej generacji, wykorzystywane w leczeniu nowotworów. Ich głównym mechanizmem działania jest zakłócanie replikacji i transkrypcji DNA [115]. Jednakże, zastosowanie leków zawierających metale na bazie platyny w terapii nowotworów jest ograniczone ze względu na ich brak specyficzności w zakresie celowania w komórki nowotworowe w stosunku do komórek zdrowych, co prowadzi do poważnych skutków ubocznych. W związku z tym, konieczne jest

poszukiwanie nowych leków przeciwnowotworowych bazujących na jonach innych metali [116]. Metalami wysokiej cytotoksyczności są iryd, złoto, srebro, kobalt i ruten. Połączenia tych ostatnich wydają się najbardziej obiecującą klasą ze względu na swoje właściwości strukturalne i koordynacyjne. Doniesienia literaturowe wskazują na wiele właściwości związków koordynacyjnych jonów rutenu [117,118]. Zaliczają się do nich między innymi:

- możliwość występowania rutenu na kilku stopniach utlenienia w warunkach fizjologicznych, dzięki czemu jest on odpowiedni do zastosowań farmaceutycznych;
- występowanie oktaedrycznej geometrii kompleksów (w odróżnieniu od kwadratowo-płaskiej struktury związków platyny(II)) pozwala na steryczne dopasowanie do biomolekuły;
- występowanie podobnej kinetyki podstawienia ligandów w procesach komórkowych, co charakteryzuje lek dużą stabilnością kinetyczną i ogranicza jego reakcje uboczne;
- zdolność do naśladowania żelaza w procesie wiązania się z białkami transferyny i albuminy surowicy krwi, co umożliwia jonom rutenu przemieszczanie się po organizmie i przenikanie przez błony biologiczne [119].

Obecnie najskuteczniejszymi kandydatami do badań klinicznych są dwa związki koordynacyjne rutenu(III) – KP1019 oraz NAMI-A [120]. Te proleki są przekształcane w bardziej aktywne formy rutenu(II) przez środowisko występujące w komórkach nowotworowych. Dzięki obecności w guzach litych cząsteczek redukujących, takich jak glutation, cysteina czy kwas askorbinowy, oraz w warunkach niedotlenienia, związki KP1019 i NAMI-A wykorzystują mechanizm tzw. „aktywacji przez redukcję” (*Rysunek 5*) [121]. Cele molekularne kompleksów jonów rutenu obejmują: retikulum endoplazmatyczne, jądro komórkowe, mitochondrium, DNA, białka wewnątrzkomórkowe i niektóre enzymy, takie jak anhydraza węglanowa i topoiizomeraza I, które zapewniają specyficzny mechanizm apoptozy komórek nowotworowych [122].





**Rysunek 5.** Schemat działania leków zawierających trójwartościowe jony rutenu.

Dotychczasowe badania wskazują, że chemia koordynacyjna rodu(III) jest interesującą alternatywą. W literaturze brakuje jednak kompleksowego przeglądu typów ich budowy ze względu na niską wydajność syntezy oraz słabą rozpuszczalność w roztworach wodnych. Biorąc pod uwagę badania biologiczne, udowodniono, że cieszą się one dużym zainteresowaniem ze względu na swoje właściwości chemiczne i biologiczne [123,124]. Kompleksy rodu(III) tworzą stabilne i różnorodne struktury metal-ligand. Mogą wiązać się z biomolekułami, zakłócać metabolizm komórkowy i wywoływać działanie przeciwnowotworowe [125]. Charakteryzują się różnorodnymi mechanizmami działania i celami molekularnymi [116]. W literaturze znajdują się informacje dotyczące interesujących szlaków przeciwnowotworowych, które wykazują kompleksy rodu(III):

- blokowanie dimeryzacji szlaku sygnałowego i aktywacji transkrypcji 3 (STAT3), hamując w ten sposób proliferację komórek nowotworowych [126];
- kierowanie działania w mitochondria i zwiększanie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS), aby uzyskać znaczące efekty przeciwnowotworowe [116];
- tworzenie silnych wiązań z biomolekułą DNA i białkami, w wyniku czego znacznie wzrasta aktywność przeciwnowotworowa [127];
- hamowanie aktywności kinaz [128].

Podsumowując, w związku rozpowszechniającym się problemem lekooporności i chorób nowotworowych konieczne jest poszukiwanie leków o większym spektrum działania biologicznego. Pochodne sulfonamidowe stanowią ciekawą ścieżkę badań ze względu na mnogość aktywności jakie wykazują. Na uwagę zasługuje również chemia

koordynacyjna trójwartościowych jonów rutenu i rodu. Badania dotyczące powyższych związków są alternatywą dla konwencjonalnych terapii. Uzyskane informacje pozwolą na zaproponowanie nowych struktur substancji o właściwościach terapeutycznych.

W ramach przedstawionej dysertacji poruszono wyżej wymienione tematy. Wykonane przeze mnie badania w Katedrze Chemii Bionieorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, stanowią integralną część jednej publikacji przeglądowej [P1] oraz czterech oryginalnych [P2-P5] w czasopismach znajdujących się na tzw. *Liście Filadelfijskiej*:

[P1] Ramotowska, S.; Ciesielska, A.; Makowski, M. What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions? *Molecules* **2021**, *26*, 3478, doi:10.3390/molecules26113478.

[P2] Ciesielska, A.; Gawrońska, M.; Makowski, M.; Ramotowska, S. Sulfonamides Differing in the Alkylamino Substituent Length – Synthesis, Electrochemical Characteristic, Acid-Base Profile and Complexation Properties. *Polyhedron* **2022**, *221*, 115868, doi:10.1016/j.poly.2022.115868.

[P3] Ramotowska, S.; Spisz, P.; Brzeski, J.; Ciesielska, A.; Makowski, M. Application of the SwitchSense Technique for the Study of Small Molecules' (Ethidium Bromide and Selected Sulfonamide Derivatives) Affinity to DNA in Real Time. *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126*, 7238–7251, doi:10.1021/acs.jpcc.2c03138.

[P4] Brzeski, J.; Ciesielska, A.; Makowski, M. Theoretical Study on the Alkylamino-Substituted Sulfonamides with Potential Biological Activity. *J. Phys. Chem. B* **2023**, *127*, 30, 6620–6627, doi:10.1021/acs.jpcc.3c01965.

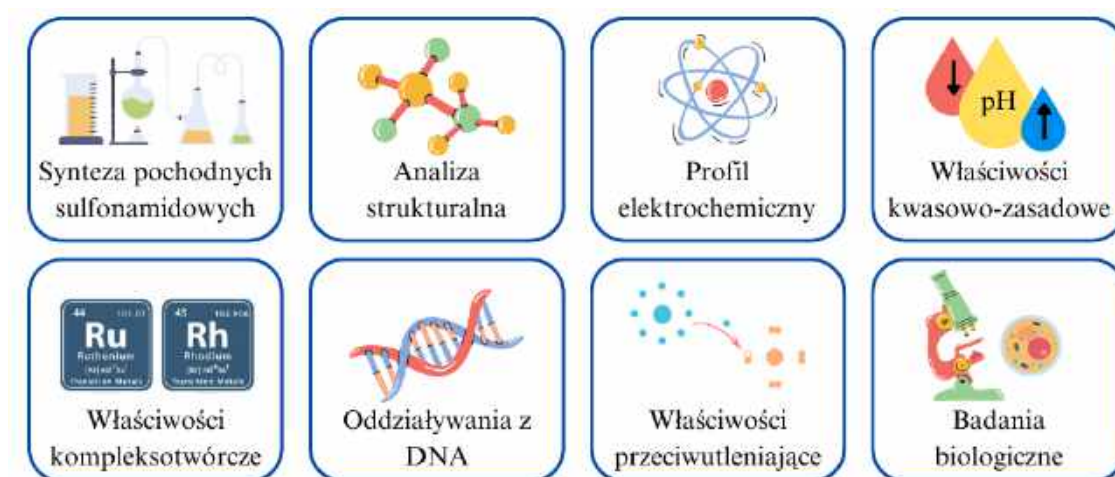
[P5] Ciesielska, A.; Brzeski, J.; Zarzeczańska, D.; Stasiuk, M.; Makowski, M.; Brzeska, S. Exploring the interaction of biologically active compounds with DNA using the SwitchSense technique, UV-Vis spectroscopy, and computational methods. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2024**, 124313, doi:10.1016/j.saa.2024.124313.

Pełne wersje wyżej wymienionych publikacji zamieszczono na końcu pracy. Artykuł [P1] to praca przeglądowa, która wraz z *Wprowadzeniem* zawartym w rozprawie stanowi jej część teoretyczną. Publikacje [P2-P5] przedstawiają wyniki badań eksperymentalnych związanych z aktualnym stanem wiedzy.

## 2. Cele badawcze pracy

Z powodu narastającego problemu lekooporności i zwiększającej się liczby zachorowalności na choroby nowotworowe, współczesna medycyna jest zmuszona do poszukiwania nowych preparatów farmaceutycznych o szerokim spektrum aktywności biologicznej. Jednymi z powszechnie stosowanych leków są sulfonamidy, które mogą ulegać licznym modyfikacjom oraz tworzyć połączenia koordynacyjne z biologicznie istotnymi jonami metali.

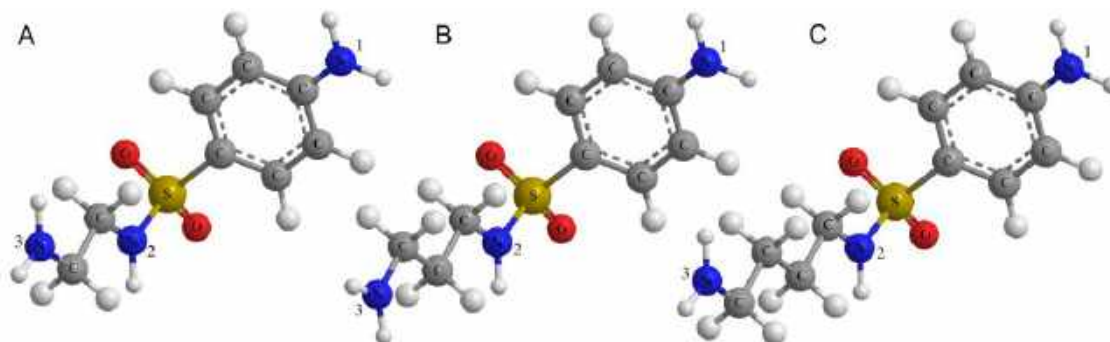
Nadrzędnym celem dysertacji było zbadanie wpływu długości łańcucha alkiloaminowego pochodnych sulfonamidowych na ich właściwości fizykochemiczne, możliwości koordynacyjne z wybranymi jonami metali, zdolność do oddziaływania z helisą DNA oraz cytotoksyczność, właściwości bakteriobójcze i przeciwutleniające. Na **Rysunku 6** przedstawiono w sposób graficzny podejmowane w pracy zagadnienia.



**Rysunek 6.** Schemat przedstawiający wykonane badania oraz podejmowaną tematykę.

Przeprowadzone badania obejmowały m.in. syntezę trzech pochodnych sulfonamidowych różniących się liczbą jednostek  $-CH_2-$  w podstawniku R (**Rysunek 7**), których nazwy systematyczne oraz akronimy prezentują się następująco:

- 4-amino-N-(2-aminoetylo)benzenosulfonamid – NethylS;
- 4-amino-N-(2-aminopropylo)benzenosulfonamid – NpropylS;
- 4-amino-N-(2-aminobutylo)benzenosulfonamid – NbutylS.



**Rysunek 7.** Struktury trzech pochodnych sulfonamidowych, będących obiektami badawczymi w niniejszej dysertacji: **A.** NethylS, **B.** NpropylS oraz **C.** NbutylS.

W celu określenia struktury otrzymanych związków zastosowano spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektrometrię mas (MS), analizę elementarną oraz spektroskopię Fouriera w podczerwieni (FTIR) z wykorzystaniem modułu osłabionego całkowitego odbicia (ATR).

Kolejnym etapem realizowanych badań była analiza profilu elektrochemicznego związków NethylS i NpropylS z wykorzystaniem woltamperometrii cyklicznej (CV) oraz pulsowej różnicowej (DPV). Została ona wykonana zarówno w środowisku protycznym, które występuje w organizmie człowieka, jak i aprotycznym ze względu na charakter lipofilowy błon komórkowych i enzymów. Pozwala to na odzwierciedlenie zachowania cząsteczek w układach biologicznych. Ponadto opisano wpływ pH środowiska na procesy redoks dwóch pochodnych sulfonamidowych, co pozwoliło na powiązanie występujących efektów elektrochemicznych z kwasowo-zasadowym charakterem związków.

Następnie określono właściwości kwasowo-zasadowe trzech omawianych cząsteczek oraz wyznaczono ich wartości  $pK_a$  z wykorzystaniem miareczkowania spektrofotometrycznego oraz potencjometrycznego. Wykonane badanie eksperymentalne zostało wsparte przez obliczenia teoretyczne. Analizy te wykonano w celu zdefiniowania zdolności związków do przenikania przez błony komórkowe oraz określenia ich formy protolitycznej w środowisku wewnątrzkomórkowym.

W dalszej części badań poddano analizie właściwości kompleksotwórcze związków NethylS i NpropylS z trójwartościowymi jonami rutenu oraz rodu. W tym celu określono stałe trwałości utworzonych kompleksów z wykorzystaniem miareczkowania potencjometrycznego. Przeprowadzone doświadczenie umożliwi zdefiniowanie preferowanego ułożenia przestrzennego związków koordynacyjnych.

Badania oddziaływań trzech pochodnych sulfonamidowych z helisą DNA pozwalają na określenie ich sposobu i siły wiązania. W tym celu zastosowano technikę switchSENSE, dzięki której wykonano pomiary w przepływie, w czasie rzeczywistym. W związku z tym, możliwa była analiza kinetyki procesu tworzenia i rozpadu adduktu związek–DNA. W konsekwencji określono wartości współczynników szybkości asocjacji ( $k_a$ ) i dysocjacji ( $k_d$ ) oraz stałe tych procesów ( $K_A$ ,  $K_D$ ). Uzyskane wyniki były pomocne w określeniu powinowactwa omawianych struktur do wybranej sekwencji dwuniciowego DNA. Badania zostały uzupełnione analizą dokowania molekularnego, dzięki czemu omówiono możliwy tryb i miejsca wiązania pochodnych sulfonamidowych z biomolekułą DNA.

Kolejna część badań miała na celu analizę właściwości przeciwutleniających związków NethylS i NpropylS z wykorzystaniem rodników DPPH $\cdot$  i ABTS $^{+\cdot}$ . Doświadczenie przeprowadzono na spektrofotometrze UV-Vis, a uzyskane wyniki pozwoliły na określenie zdolności pochodnych sulfonamidowych do wychwytywania reaktywnych form tlenu (ROS).

Ostatnia część badań została poświęcona analizie cytotoksyczności oraz testom mikrobiologicznym, które dostarczają informacji o aktywności biologicznej badanych pochodnych sulfonamidowych.

### 3. Opis stosowanych metod badawczych

#### 3.1. Synteza pochodnych sulfonamidowych

Syntezę prowadzono w pirydynie z wykorzystaniem chlorku N-acetylosulfanililu oraz odpowiednią diamina z osłoną Boc na jednej grupie aminowej. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze 60°C przez 4 godziny. Postęp reakcji monitorowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na żelu krzemionkowym (Merck) w układzie rozpuszczalnika chloroform-metanol-amoniak (25%) (v/v/v = 5:1:0,1). Po zakończeniu reakcji mieszaninę wylano do wody z lodem i zakwaszono 1 M HCl. Otrzymano olej, który zestalił się przez noc. Stały produkt oddzielono od fazy ciekłej przez odsączenie, a następnie przemyto wodą i wysuszono na powietrzu w temperaturze pokojowej. Otrzymano związki Ac-NethylS-BOC, Ac-NpropylS-BOC oraz Ac-NbutylS-BOC.

W następnym etapie do etanolowych roztworów związków dodano 1 ml stężonego HCl. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 70°C przez noc, następnie rozcieńczono wodą i zalkalizowano NaHCO<sub>3</sub> do pH 8. Postęp reakcji monitorowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) w takich samych warunkach jak w etapie pierwszym. Roztwór odparowano, a pozostałość oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, Merck) w układzie rozpuszczalników kolejno: octan etylu – metanol 50:1; 40:1; 30:1; 20:1; 10:1; 5:1; 2:1 (v/v). Otrzymano związki NethylS, NpropylS i NbutylS w postaci gęstego oleju. W związku z tym, konieczne było przeprowadzenie związków w dichlorowodorki w celu otrzymania osadu. Do roztworów związków w mieszaninie octanu etylu i metanolu dodano niewielki nadmiar molowy roztworu chlorowodoru w eterze etylowym (2,0 M w eterze dietylowym). Związki pochodnych sulfonamidowych w postaci dichlorowodorków wytrąciły się, zostały przesączone, przemyte i wysuszone na powietrzu w temperaturze pokojowej. Wydajność syntezy dla związku NethylS wynosiła 43%, NpropylS – 40% i NbutylS – 35%.

Synteza organiczna pochodnych sulfonamidowych została wykonana w Katedrze Chemii Bionieorganicznej Wydziału Chemii UG przeze mnie we współpracy z dr inż. Małgorzatą Gawrońską.

### **3.2. Charakterystyka strukturalna związków**

Analizy  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR zostały zarejestrowane na spektrometrze Bruker AVANCE III (500 MHz). Widma masowe (MS) wykonano na instrumencie Bruker Daltonics (HCT Ultra). Analiza elementarna została zarejestrowana w analizatorze Elementar Vario El Cube.

Widma w podczerwieni wykonano na spektrometrze Perkin Elmer Spectrum Two FTIR z wykorzystaniem modułu osłabionego całkowitego odbicia (ATR) z kryształem diamentu w zakresie widmowym  $4000 \div 400 \text{ cm}^{-1}$ .

W celu określenia zawartości chlorków w pochodnych sulfonamidowych wykorzystano metodę miareczkowania potencjometrycznego. Analizę wykonano przy użyciu sterowanego automatycznie mikrotitratora CerkoLab, wyposażonego w elektrodę z chlorku srebra (Schott). Przygotowano roztwór zawierający znaną ilość wzorca (NaCl) i próbki sulfonamidów do analizy w wodzie o stężeniu  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  i objętości 10 ml. Podczas wykonywania miareczkowań potencjometrycznych układ sekwencyjnie rejestrował potencjał i dozował porcje titranta ( $\text{AgNO}_3$ ; 0,1 M) w stałej objętości (0,008359 ml) ze strzykawki (1 ml; Hamilton). Każdy pomiar potencjometryczny składał się ze 120 kroków i był wykonywany w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ . Procedurę powtórzono trzykrotnie.

Badania NMR, MS oraz analiza elementarna zostały wykonane w Sekcji Pomiarów Fizyko-Chemicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

### **3.3. Pomiary fizykochemiczne**

#### **3.3.1. Pomiary woltamperometryczne**

Pomiary elektrochemiczne przeprowadzono przy użyciu potencjostatu Autolab PGSTAT204 (Metrohm Autolab B.V., Holandia), sterowanego oprogramowaniem Nova.

We wszystkich badaniach woltamperometrii cyklicznej (CV) i pulsowej różnicowej (DPV) wykorzystano układ trzech elektrod. Jako elektrodę roboczą zastosowano elektrodę z węgla szklistego (GCE) o średnicy 2 mm, którą przed każdym pomiarem starannie polerowano przy użyciu zawiesiny tlenku glinu o wielkości  $0,5 \mu\text{m}$  (Buehler). Elektrodą pomocniczą był drut platynowy. Do badań w roztworach wodnych (środowisku protycznym) zastosowano elektrodę chlorosrebrową w 1 M roztworze NaCl, jako elektrodę odniesienia. Podczas pomiarów w środowisku aprotycznym (DMSO) zastosowano elektrodę chlorosrebrową umieszczoną w metanolowym roztworze 0,1 M nadchloranu tetrabutylamoniowym (TBAP).

Do wszystkich pomiarów woltamperometrycznych stosowano  $1 \cdot 10^{-3}$  M roztwory sulfonamidów. Podczas badań w środowisku wodnym zastosowano 0,1 M nadchloran sodu ( $\text{NaClO}_4$ ) jako elektrolit, w roztworach niewodnych użyto natomiast 0,1 M TBAP. W celu określenia wpływu zmiany pH na rejestrowane procesy redoks dodawano do przygotowanych zgodnie z opisem roztworów pochodnych sulfonamidowych 0,1 M kwas solny (HCl) oraz 0,1 M wodorotlenek potasu (KOH). Wszystkie pomiary woltamperometryczne wykonano w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ . Roztwory odgazowano przepuszczając przez nie argon. Powtarzalność wyników zapewniono poprzez trzykrotną rejestrację woltamperogramów dla każdego doświadczenia.

### 3.3.2. Badanie właściwości kwasowo-zasadowych

W celu określenia właściwości kwasowo-zasadowych pochodnych sulfonamidowych oraz wyznaczenia wartości  $pK_a$  wykorzystano miareczkowanie spektrometryczne oraz potencjometryczne. Pomiary widm UV-VIS zostały wykonane na spektrofotometrze Evolution 300 (Thermo Scientific, USA). Wartości pH roztworu badano po dodaniu każdej porcji titranta zastosowano automatyczny układ do mikromiareczkowania Cerko-Lab, wyposażony w elektrodę pH Hydromet.

Roztwory analitu zostały przygotowane poprzez rozpuszczenie pochodnej sulfonamidowej w  $5,27 \cdot 10^{-3}$  M kwasie solnym (HCl), tak aby stężenie analizowanego związku wynosiło  $6 \cdot 10^{-5}$  M. Układ miareczkowano w stałej objętości (0,008359 ml) ze strzykawki Hamilton o pojemności 1 ml roztworem  $2,09 \cdot 10^{-3}$  M wodorotlenku potasu (KOH). Każdy wykonany pomiar składał się ze 120 kroków. Wszystkie pomiary wykonano w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ . Procedurę wykonano dwukrotnie.

Wartości stałych dysocjacji kwasów obliczono za pomocą równania Hendersona-Hasselbacha (1) zaimplementowanego w programie Origin Lab:

$$A = \frac{A_1 + A_2 \cdot 10^{(pH - pK_{a1})}}{10^{(pH - pK_{a1})} + 1} + \frac{A_2 + A_3 \cdot 10^{(pH - pK_{a2})}}{10^{(pH - pK_{a2})} + 1} + \frac{A_3 + A_4 \cdot 10^{(pH - pK_{a3})}}{10^{(pH - pK_{a3})} + 1} \quad (1)$$

gdzie  $A_n$  jest absorbancją różnych form protolitycznych. Pomiary i wyznaczanie wartości  $pK_a$  opierają się na zmianie intensywności absorpcji w funkcji pH roztworu [129,130].

### 3.3.3. Badanie właściwości kompleksotwórczych

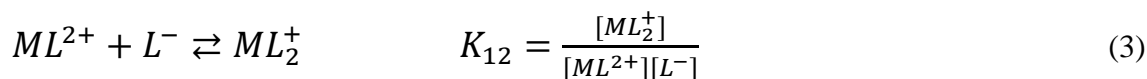
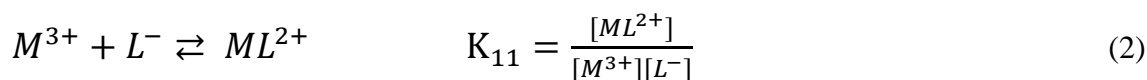
Analizy właściwości kompleksujących pochodnych sulfonamidowych z jonami rutenu(III) i rodu(III) prowadzono metodą miareczkowania potencjometrycznego. W tym celu zastosowano automatyczny układ do mikromiareczkowania Cerko-Lab,



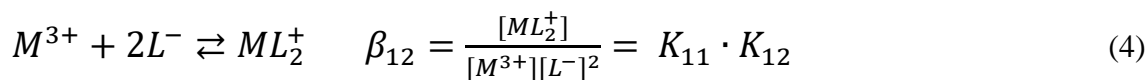
wyposażonego w elektrodę pH (Hydromet) o parametrach kalibracyjnych  $E = 402,18 \text{ mV}$  i  $S = -57,82 \text{ mV}$  na jednostkę pH.

Roztwór do analizy, o objętości 4 ml, przygotowano poprzez rozpuszczenie pochodnej sulfonamidowej w  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M HCl}$ , tak aby stężenie związku wynosiło  $3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ . Do analitu dodano również odpowiednią sól jonu metalu ( $\text{RuCl}_3$  lub  $\text{RhCl}_3$ ), a jego stężenie w mieszaninie wynosiło  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ . Podczas wykonywania miareczkowań potencjometrycznych układ sekwencyjnie rejestrował potencjał i dozował porcje titranta ( $\text{KOH}$ ;  $0,1 \text{ M}$ ) w stałej objętości ( $0,004162 \text{ ml}$ ) ze strzykawki ( $0,5 \text{ ml}$ ; Hamilton). Każdy pomiar składał się ze 120 kroków i został wykonany w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ . Procedurę powtórzono dwukrotnie.

Stopniowe i skumulowane stałe tworzenia związków wyznaczono za pomocą metody ogólnej J. Kostrowickiego i A. Liwo zaimplementowanej do pakietu obliczeniowego CVEQUID [131,132]. Wykorzystuje ona analizę nieliniową krzywej miareczkowania wyznaczonej eksperymentalnie, dzięki czemu zostaje dopasowany teoretyczny model równowag. Nieznane parametry dobiera się tak, aby dane uzyskane eksperymentalnie pokrywały się z założonym modelem równowagi. Stopniowe stałe tworzenia ( $K_{11}$  i  $K_{12}$ ), opisujące kolejne powstawanie kompleksu o stechiometrii 1:1 i 1:2 (metal: ligand), można przedstawić za pomocą następujących równań (2) i (3):



skumulowaną stałą stabilności można wyrazić równaniem (4):



gdzie  $M^{3+}$  jest jonem metalu,  $L^{-}$  – ligandem, natomiast  $ML^{2+}$  oraz  $ML_2^{+}$  formy jonów kompleksowych.

### 3.3.4. Badanie oddziaływań z DNA przy pomocy techniki switchSENSE

Badanie oddziaływań pochodnych sulfonamidowych z biomolekułą DNA przeprowadzono z wykorzystaniem techniki switchSENSE na aparacie heliX – Dynamic Biosensors. W rezultacie wyznaczono wartości stałych asocjacji ( $K_A$ ) i dysocjacji ( $K_D$ ) oraz szybkości ( $k_a$ ,  $k_d$ ) tych procesów.

Technika switchSENSE wykorzystuje chipy (HeliX-ADP-2-0), zbudowane ze złotej powierzchni i zakotwiczonych na niej nici kwasu nukleinowego, składających się z 48 par zasad (sekwencja zastrzeżona przez producenta). W procesie funkcjonalizacji zostaje przyłączony do niej fragment nici DNA, w której wyróżnia się adapter (5'-48 zasad + TAG TGC TGT AGG AGA ATA TAC GGG CTG CTC GTG TTG ACA AGT ACT GAT-3') z przyłączonym fluoroforem oraz nić komplementarną (5'-ATC AGT ACT TGT CAA CAC GAG CAG CCC GTA TAT TCT CCT ACA GCA CTA-3') (**Rysunek 8**). Możliwe są dwa tryby pracy aparatury: dynamiczny i statyczny. W pierwszym trybie, przyłączone do powierzchni chipa tzw. nanodźwignie można wprowadzić w kontrolowany ruch poprzez zmianę napięcia na powierzchni elektrod. Cząsteczki analitu wiążące się z nicią DNA spowalniają ruch nanodźwigni, w wyniku czego zmieniają się jej oscylacje i fluorescencja barwnika. Parametry te są następnie wykorzystywane do zdefiniowania szeregu parametrów kinetycznych i biofizycznych. Metoda ta umożliwia m.in. określanie wielkości cząsteczek i konformacji białek. W trybie statycznym nanodźwignia nie porusza się, a podczas oddziaływania analitu z DNA, wewnątrz barwnika fluorescencyjnego zachodzą zmiany fizykochemiczne. Dzięki temu możliwa jest pełna analiza kinetyczna tworzącego się adduktu DNA-analit.



**Rysunek 8.** Schemat przedstawiający budowę powierzchni chipa po procesie funkcjonalizacji.

Analizowanymi w publikacjach [P3] i [P5] związkami były: bromek etydydy (EB), sulfatiazol (STZ), NethylS, NpropylS, NbutylS, pirazyno-2-tiokarboksyamid (PTCA),

1-(2-hydroksyetyloamino)-antraceno-9,10-dion (AQ-NetOH) oraz netropsyna (NET). Związki EB, STZ, PTCA oraz NET zakupiono w Sigma-Aldrich. Syntezę oraz właściwości fizykochemiczne homologów sulfonamidowych opisano w publikacjach [P2] i [P4]. Pochodna antrachinonu (AQ-NetOH) została zsyntezowana w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemii UG przez dr hab. Pawła Niedziałkowskiego, prof. UG zgodnie z procedurą opisaną przez Krapcho i Shaw [133].

Serię próbek do analizy przygotowano zgodnie z danymi zawartymi w *Tabeli 2*.

*Tabela 2. Informacje dotyczące przygotowania serii roztworów do pomiarów oraz temperatura analiz wykonanych na aparacie heliX – Dynamic Biosensors.*

Związek	Zakres stężeń	Współczynnik rozcieńczenia	Bufor	Temperatura [°C]
<b>EB</b>	$1 \cdot 10^{-6} \text{ M} - 1 \cdot 10^{-9} \text{ M}$	2 i 10	PE40, PE140	15, 25, 37
<b>STZ</b>	$1 \cdot 10^{-4} \text{ M} - 1,25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	2	PE40	15, 25, 37
<b>NethylS</b>	$2 \cdot 10^{-4} \text{ M} - 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	2	PE40	15, 25, 37
<b>NpropylS</b>	$8 \cdot 10^{-4} \text{ M} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	2	PE40	15, 25, 37
<b>NbutylS</b>	$8 \cdot 10^{-4} \text{ M} - 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	2	PE40	25, 30, 37
<b>PTCA</b>	$8 \cdot 10^{-4} \text{ M} - 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	2	TE40	25, 30, 37
<b>AQ-NetOH</b>	$2 \cdot 10^{-5} \text{ M} - 1,25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	2	TE40	25, 30, 37
<b>NET</b>	$2 \cdot 10^{-4} \text{ M} - 1,25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	2	TE40	25, 30, 37

Stosowane bufony zakupiono od firmy Dynamic Biosensors, których skład jest następujący: PE140 (pH 7,4; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 0,05% Tween20, 50 μM EDTA, 50 μM EGTA), PE40 (pH 7,4; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mM NaCl, 0,05% Tween20, 50 μM EDTA, 50 μM EGTA) oraz TE40 (10 mM Tris-HCl, 40 mM NaCl, 0,05 % Tween20, 50 μM EDTA, 50 μM EGTA) [134].

Podczas pomiarów stosowano roztwór regeneracyjny służący do denaturacji dwuniciowych fragmentów DNA, w wyniku czego na powierzchni chipu pozostawione są jedynie jednociowe sekwencje kotwiczące. Ponadto wykorzystywano również roztwór pasywacyjny, zawierający związki tiolowe. Służy on do przemywania powierzchni elektrody w wyniku czego zapobiega niespecyficznemu wiązaniu zakotwiczonych nici kwasu nukleinowego do adaptera. Pozwala to na zwiększenie przyłączonych helis DNA

do powierzchni chipa oraz przedłuża jego żywotność. Wszystkie odczynniki, z wyjątkiem badanych analitów, zostały zakupione od producenta Dynamic Biosensors.

Pierwszym krokiem wszystkich eksperymentów była funkcjonalizacja powierzchni chipa. Stężenie adaptera wynosiło  $1 \cdot 10^{-7}$  M, a czas tego procesu obejmował 200 s. Następnie przeprowadzono właściwą analizę kinetyki. Czas poświęcony na proces asocjacji i dysocjacji analitu do DNA został określony eksperymentalnie. Szybkość przepływu we wszystkich przypadkach wynosiła 200  $\mu$ l/s. Proces dysocjacji prowadzono do całkowitego wypłukania analitu z układu przez bufor. Próbę ślepą przeprowadzono przed i po serii stężeń. Sprawdzenie stanu i parametrów zastosowanych chipów, przed i po pomiarze wykonano przeprowadzając test chipu.

Pomiary zostały zarejestrowane w trzech temperaturach:

- 37°C, która odpowiada temperaturze ciała człowieka;
- 25°C, czyli temperaturze pokojowej, która jest zazwyczaj utrzymywana w laboratoriach chemicznych oraz do przeprowadzania eksperymentów;
- 15°C lub 30°C w celu analizy wpływu zmiany temperatury na parametry kinetyczne.

Uzyskane wartości analizowanych parametrów kinetycznych zostały obliczone za pomocą oprogramowania heliOS (v2023.1.1). Otrzymane krzywe zmian fluorescencji dopasowano do modelu oddziaływania 1:1 wyrażonego przez następujące równania (5,6):

$$y = A(1 - e^{-(k_a \cdot c + k_d) \cdot (x - t_a)}) + y_0 \quad (5)$$

$$y = A(1 - e^{-k_d \cdot (x - t_d)}) + y_0 \quad (6)$$

gdzie  $A$  to amplituda sygnału,  $t_a$  i  $t_d$  – czasy rozpoczęcia procesów asocjacji i dysocjacji,  $y_0$  – linia bazowa,  $c$  – stężenie,  $k_a$  i  $k_d$  – szybkości asocjacji i dysocjacji. Na podstawie powyższych równań (5,6) można obliczyć stałą asocjacji ( $K_A$ ) na podstawie równania (7):

$$K_A = \frac{k_a}{k_d} \quad (7)$$

Badania związków EB, STZ, AQ-NetOH oraz NET z wykorzystaniem techniki switchSENSE zostały wykonane w Katedrze Chemii Bionieorganicznej Wydziału Chemii UG przez dr Sandrę Brzeską oraz dr inż. Paulinę Spisz, natomiast analiza PTCA i NbutylS została przeprowadzona we współpracy z mgr Magdaleną Stasiuk.

### 3.3.5. Badanie oddziaływań z DNA przy pomocy miareczkowania spektrofotometrycznego

Do zbadania oddziaływania związku 1-(2-hydroksyetyloamino)-antraceno-9,10-dion (AQ-NetOH) z helisą wykorzystano miareczkowanie spektrofotometryczne. Analizy przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 650 UV–Vis. Widma rejestrowano w zakresie długości fal od 200 do 700 nm przy użyciu kuwety kwarcowej o średnicy 1 cm. Bufor TE40 o pH 7,4 służył jako roztwór odniesienia. Roztwór DNA przygotowano przez rozcieńczenie DNA grasicy cielęcej (CT-DNA) uzyskanego od Sigma-Aldrich w buforze TE40 (pH 7,4) zakupionego od firmy Dynamic Biosensors (ten sam, który został wykorzystany w technice switchSENSE).

Na podstawie pomiaru absorbancji roztworu DNA przy długości fali 260 nm określono jego stężenie ( $2,88 \cdot 10^{-4}$  M), którego molowy współczynnik absorpcji wynosi  $6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Optymalne do pomiarów spektrofotometrycznych roztwory AQ-NetOH przygotowano poprzez rozpuszczenie porcji związku w Tris/HCl (pH 7,4) i poprzez kolejne rozcieńczenia doprowadzono do stężenia  $2,52 \cdot 10^{-5}$  M. Miareczkowanie spektrofotometryczne przeprowadzono przy użyciu automatycznego układu w trybie ciągłym, wprowadzając stałe porcje roztworu DNA do kuwety pomiarowej w odstępach 3-minutowych. Ustalono wcześniej, że po dodaniu jednej porcji roztworu DNA w nadmiarze do roztworu AQ-NetOH nie zaobserwowano zmian absorbancji w czasie. Aby uniknąć efektu rozcieńczenia roztworu w kuwecie (w wyniku dodania titranta) wprowadzono korektę stężenia. Wartość stałej wiązania (asocjacji) wyznaczono za pomocą równania Benesiego-Hildebranda (8) [135]:

$$\frac{A_0}{(A-A_0)} = \frac{1}{(A_\infty-A_0)} + \frac{1}{(A_\infty-A_0)K} \cdot \frac{1}{[DNA]} \quad (8)$$

gdzie  $A_0$  to absorbancja związku bez dodatku DNA,  $A$  – absorbancja przy różnych stężeniach DNA,  $A_\infty$  – końcowa absorbancja powstałego adduktu AQ-NetOH–DNA,  $K$  – stała wiązania oraz  $[DNA]$  – stężenie roztworu DNA. Zależność tę można przedstawić w postaci równania liniowego  $y = ax + b$ , w którym zmiennymi są  $A_0/(A - A_0)$  oraz  $1/[DNA]$ .

Badanie oddziaływania związku AQ-NetOH z biomolekułą DNA wykonane z użyciem miareczkowania spektrofotometrycznego zostało wykonane w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemii UG przez dr Dorotę Zarzeczkańską.

### 3.3.6. Badanie właściwości przeciwutleniających

W celu określenia zdolności dwóch pochodnych sulfonamidowych (NethylS i NpropylS) do wychwytywania reaktywnych form tlenu (ROS) wykonano analizę właściwości przeciwutleniających z wykorzystaniem rodników  $ABTS^{+}$  oraz DPPH $\cdot$ .

Roztwór kationu rodnika  $ABTS^{+}$  otrzymano w reakcji kwasu ABTS z nadsiarczanem potasu ( $K_2S_2O_8$ ). Rozpuszczono 22,5 mg ABTS oraz 5 mg  $K_2S_2O_8$  w 50 ml buforu Tris-HCl o pH 7,4. Mieszaninę pozostawiono w ciemności na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie dobrano eksperymentalnie stężenie  $ABTS^{+}$ , tak aby maksimum absorpcji roztworu wynosiło 2 w danych warunkach pomiarowych. Przygotowano serię rozcieńczeń związków w buforze Tris-HCl o pH 7,4, o następujących stężeniach:

- NethylS – 10 mM, 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM;
- NpropylS – 10 mM, 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM.

Próbki do analizy sporządzono poprzez zmieszanie 1 ml roztworu rodnika oraz 1 ml roztworu badanego związku o danym stężeniu. Roztwór odniesienia przygotowano przez 2-krotnie rozcieńczenie  $ABTS^{+}$  buforem Tris. Wszystkie próbki inkubowano przez 1 godzinę w ciemnym miejscu. Następnie spektrofotometrycznie monitorowano zmianę absorbancji przy 734 nm. Procentowe wychwytywanie [S] rodnika  $ABTS^{+}$  obliczono przy użyciu wzoru (9):

$$S [\%] = \frac{A_0 - A_p}{A_0} \cdot 100\% \quad (9)$$

gdzie  $A_0$  to absorbancja próby kontrolnej, a  $A_p$  – absorbancja analizowanej próbki.

Roztwór rodnika DPPH $\cdot$  przygotowano poprzez rozpuszczenie 4 mg związku w 50 ml metanolu. Mieszaninę pozostawiono w ciemności na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie dobrano eksperymentalnie stężenie DPPH $\cdot$ , tak aby maksimum absorpcji roztworu wynosiło 2. Przygotowano serię roztworów pochodnych sulfonamidowych w wodzie o takich samych stężeniach jak dla analizy z rodnikiem  $ABTS^{+}$ . Próbki przygotowano poprzez zmieszanie 1 ml roztworu DPPH $\cdot$  oraz 1 ml roztworu badanego związku, a następnie inkubowano przez 1 godzinę w ciemnym miejscu. Monitorowano spektrofotometrycznie zmianę absorbancji przy długości fali 515 nm.

Badanie wykonano we współpracy z dr. hab. Dariuszem Wyrzykowskim, prof. UG oraz dr Aleksandrą Tesmar z Katedry Chemii Ogólnej i Nieorganicznej Wydziału Chemii UG.

### 3.4. Obliczenia teoretyczne

Obliczenia oparte o metody gęstości funkcyjonału (ang. *Density Functional Theory* - DFT) zostały wykorzystane do określenia miejsc wiązania i energii oddziaływania badanych związków (bromku etydyny (EB), sulfatiazolu (STZ), NetylS, NpropylS, NbutylS, pirazyno-2-tiokarboksyamid (PTCA), 1-(2-hydroksyetyloamino)-antraceno-9,10-dion (AQ-NetOH)) z fragmentem helisy DNA wykorzystywanym w badaniach eksperymentalnych.

Struktury równowagowe wszystkich analitów zostały uzyskane poprzez optymalizację geometrii z wykorzystaniem funkcyjonału wB97XD [136], w tym dyspersji empirycznej i zestawu bazowego typu Pople'a 6-311++G(2d,2p) [137]. Następnie obliczono stałe siły i częstotliwości drgań, aby upewnić się, że zoptymalizowane struktury stanowią prawdziwe minima na powierzchni energii potencjalnej. Środowisko wodne ( $\epsilon = 78,3553$ ) roztworu zostało przybliżone poprzez zastosowanie przewodnikowego ciągłego modelu polaryzacji solwatacji (ang. *conductor-like polarization continuum model* – CPCM) [138] w obliczeniach w publikacji [P3]. Wpływ rozpuszczalników (wody o  $\epsilon = 78,3553$  i n-oktanolu o  $\epsilon = 9,8629$ ) wyliczony w publikacji [P4] przybliżono stosując metodę samouzgodnionego pola reakcji (ang. *Self-Consistent Reaction Field* - SCRF) [139] i modelu gęstości rozpuszczalnika (ang. *Solvation Model Density* – SMD) [140]. Wszystkie obliczenia z zakresu chemii obliczeniowej przeprowadzono przy użyciu pakietu obliczeniowego GAUSSIAN16 (wersja C.01) [141].

W celu symulacji dokowania molekularnego użyto programu AutoDock 4.2, wersja 4.2.6 [142]. Do zbudowania struktury receptora w oparciu o sekwencję helisy DNA stosowaną w technice switchSENSE wykorzystano NAB (Nucleic Acid Builder) [143]. Tak otrzymany układ poddano symulacji dynamiki molekularnej (ang. *Molecular Dynamics* – MD) z wykorzystaniem pola siłowego OL15 [144] w ramach pakietu obliczeniowego AMBER14 [145]. Wykorzystane w obliczeniach struktury analitów oraz helisa DNA zostały pozbawione niepolarnych atomów wodoru dla przyspieszenia czasu obliczeń. Dla wspomnianych konstrukcji obliczono ładunki cząstkowe Gasteigera [146], które następnie wykorzystano w symulacjach dokowania. Wiązanie analitów z helisą DNA zostało przeprowadzone przy użyciu Algorytmu Genetycznego.

Wartości  $pK_a$  odpowiadające różnym stanom sprotonowania sulfonamidów obliczono metodą bezpośrednią, która wykorzystuje cykl termodynamiczny [147]. Aby wyeliminować błędy wynikające z niedokładnych różnicowych energii wolnych solwatacji kwasu i sprzężonej zasady zastosowano metodę Muckermana [148]. Hydrofilowość analizowanych związków oceniano poprzez obliczenie wartości  $\log P$  [149]. Ponadto w celu określenia stopnia kowalencji badanych wiązań wodorowych przeprowadzono analizę Fuzzy Bond Order (FBO) [150].

Wszystkie obliczenia teoretyczne zawarte w publikacjach [P3-P5] zostały wykonane w Katedrze Chemii Bionieorganicznej Wydziału Chemii UG przez dr. Jakuba Brzeskiego.

### **3.5. Badania biologiczne**

#### **3.5.1. Badanie cytotoksyczności**

Badania biologiczne trzech pochodnych sulfonamidowych (NethylS, NpropylS oraz NbutylS) wykonano na dwóch ludzkich liniach komórkowych: HB2 (nie-nowotworowe komórki nabłonka piersi) i SKBr3 (gruczolakorak piersi).

Komórki hodowano w pożywce Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma) uzupełnionej 10% płodową surowicą bydlęcą (Gibco), 100 U/ml penicyliny/100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycyny (Sigma), a w przypadku linii HB2 dodawano także 5  $\mu\text{g/ml}$  hydrokortyzonu (Sigma) i 10  $\mu\text{g/ml}$  ludzkiej insuliny (Sigma). Komórki namnażano i hodowano w temperaturze 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Analizowane związki dodawano do pożywki hodowlanej na 48 godzin przed przeprowadzeniem testów cytotoksyczności (MTT).

Komórki wysiewano na 96-dółkową płytkę dzień przed dodaniem związków NethylS, NpropylS, NbutylS. Po upływie 48 godzin od dodania badanych związków, pożywkę hodowlaną zastąpiono świeżą pożywką zawierającą 0,5 mg/ml soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy) (Sigma). Komórki inkubowano w temperaturze 37°C, 5% CO<sub>2</sub> przez kolejne 4 godziny. Kryształy formazanu powstałych w komórkach rozpuszczono poprzez dodanie roztworu DMSO, a następnie przeprowadzono pomiary absorbancji przy OD = 590 nm.



Badania zostały wykonane przez członków Pracowni Molekularnej i Komórkowej Nefrologii, Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, Polskiej Akademii Nauk.

### 3.5.2. Badania mikrobiologiczne

Badania mikrobiologiczne trzech pochodnych sulfonamidowych (NethylS, NpropylS oraz NbutylS) wykonano na szczepach bakterii *G(+)* (*Staphylococcus aureus* – gronkowca złocistego), *G(-)* (*Escherichia coli* – pałeczki okrężnicy) oraz drożdży *Candida albicans*.

Pierwszy etap badań obejmował określenie minimalnego stężenia hamującego wzorstu mikroorganizmów (MIC). Analizy wykonano na 96-dołkowej płytce, w której umieszczono roztwory pochodnych sulfonamidowych oraz pożywkę bakteryjną Mueller-Hinton uzupełnioną kationami – CA-MHB (Becton, Dickinson and Company), w taki sposób aby objętość mieszaniny była równa 100  $\mu$ l, a stężenia sulfonamidów wynosiły 800  $\mu$ M, 700  $\mu$ M, 600  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 250  $\mu$ M oraz 100  $\mu$ M. Następnie do każdego dołka dodano 10  $\mu$ l zawiesiny bakterii lub drożdży o stężeniu  $5 \cdot 10^5$  CFU/ml. Równocześnie wykonano również próbę kontrolną w trzech dołkach dodając 100  $\mu$ l pożywki i 10  $\mu$ l roztworu mikroorganizmów. Następnie wysiano ich zawartość na szalkach Petriego zawierających podłoże TSA (tryptone-soja-agar)(BTL). Próbkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny.

Kolejny etap polegał na wyznaczeniu najmniejszego stężenia bakteriobójczego (MBC), które wykazuje redukcję 99,9% mikroorganizmów. Badania przeprowadzono na 96-dołkowych płytkach zawierających 80  $\mu$ l pożywki bakteryjnej Mueller-Hinton uzupełnionej kationami – CA-MHB oraz 20  $\mu$ l roztworu pochodnych sulfonamidowych o stężeniu 4 mM. Do każdego dołka dodano 10  $\mu$ l zawiesiny bakterii lub drożdży o stężeniu  $5 \cdot 10^5$  CFU/mL. Następnie mieszaniny wysiano na szalkach Petriego zawierających pożywkę TSA i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C.

Badania zostały wykonane w Zakładzie Badań Związków Biologicznie Czynnych, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed przez mgr Magdalenę Stasiuk pod okiem prof. dr hab. inż. Aleksandry Królickiej.

## **4. Przedmiot badań oraz komentarz**

### **4.1. [P1] What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions?**

W publikacji przeglądowej [P1] podjęto dyskusję dotyczącą zastosowania technik elektrochemicznych w analizie oddziaływań związków chemicznych z biomolekułą DNA. Określenie ich rodzaju i siły jest nieodzownym elementem badań nad poszukiwaniem nowych farmaceutyków. W tego typu badaniach coraz częściej wykorzystuje się metody elektrochemiczne, ze względu na ich czułość, prostotę i niski koszt. W artykule zebrano i omówiono różne podejścia elektrochemiczne stosowane w badaniu oddziaływań pomiędzy środkami farmaceutycznymi, a biomolekułą DNA. Główny nacisk położono na prace z ostatniej dekady, ze szczególnym uwzględnieniem technik woltamperometrycznych. Przedstawiono najbardziej preferowane podejścia eksperymentalne, materiały elektrodowe oraz nowe metody modyfikacji.

W rozdziale pierwszym omówiono możliwe sposoby oddziaływań farmaceutyków z biomolekułą DNA. Opisano i wyjaśniono m.in. zjawisko interkalacji oraz tworzenie wiązań niekowalencyjnych w małym lub dużym rowku wraz z przykładami leków reagującymi w ten sposób. Ponadto przedyskutowano techniki stosowane do analizy oddziaływań z DNA, wyróżniając m.in. metody spektroskopowe i spektroskopię UV–Vis, dichroizm liniowy i kołowy, spektrofluorymetrię, dializę równowagową, modelowanie molekularne, czy też powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR).

Rozdział drugi koncentruje się na technikach elektrochemicznych wykorzystywanych w badaniu oddziaływań potencjalnych leków z DNA. Opisano zasadę wykonania pomiaru oraz rodzaje elektrod stosowane w tym celu. Zaznaczono tutaj, że obserwowane zmiany mogą obejmować m.in. przesunięcie potencjału formalnego pary redoks oraz spadek natężenia prądu szczytowego, co wynika z nagłego spadku współczynnika dyfuzji po związaniu farmaceutyku z DNA. Podczas wykonywania eksperymentu stężenie środka farmaceutycznego w roztworze nie ulega zmianie. Do mieszaniny stopniowo dodaje się DNA. Dzięki temu określa się wpływ kolejnych fragmentów (zwiększających stężenie DNA) na procesy redoks badanego układu. Alternatywną metodą jest modyfikacja elektrody polegająca na unieruchomieniu jednego z analizowanych elementów układu (badanego związku o aktywności biologicznej) lub DNA na powierzchni elektrody roboczej. Podejście drugie jest często wykorzystywane w celu uzyskania systemów biosensorów DNA do monitorowania interakcji leków.

W związku z czym, w tym rozdziale poruszono również tematykę biosensorów elektrochemicznych.

W części trzeciej artykułu opisano metody i sposoby ich działania woltamperometrii cyklicznej (CV) oraz pulsowej różnicowej (DPV). W pracy poruszono również mniej popularne techniki takie jak woltamperometria fali prostokątnej (SWV), czy też elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS). Wymienione metody dostarczają informacji m.in. na temat:

- wartości współczynnika dyfuzji zarówno cząsteczki, jak i jej adduktu z DNA;
- powinowactwa wiązania, które wyraża się jako wartość stałej wiązania;
- rodzaju trybu oddziaływania;
- wielkości miejsca/miejsc wiązania, w którym zachodzą oddziaływania lek-DNA.

W publikacji wyróżniono zasadnicze parametry wszystkich opisanych w artykule badań, stosowane metody elektrochemiczne, materiały elektrod oraz układy, w których prowadzono omawiane badania. Wymieniono również wartości granic wykrywalności (LOD) i/lub granic oznaczalności (LOQ) oraz stałą wiązania, a także informację o sugerowanym mechanizmie oddziaływania. Przedmiotem omówionych badań były m.in. leki przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, przeciwcukrzycowe, przeciwdepresyjne oraz flawonoidy.

Wyniki badań zebrane w omawianym artykule przeglądowym pokazują, że metody elektrochemiczne są potężnym narzędziem w badaniach oddziaływań DNA-lek. Zaprezentowane dane literaturowe ilustrują kierunki badań i możliwości, jakie dają techniki woltamperometryczne. Zrozumienie mechanizmu oddziaływania DNA z lekiem ma kluczowe znaczenie w badaniach biologicznych nad procesami projektowania leków i rozwoju farmaceutycznego. Niezwykle przydatne w tym celu jest zastosowanie technik woltamperometrycznych. Ponadto, biocujniki elektrochemiczne charakteryzują się wysoką selektywnością i są wygodne w użyciu. Ze względu na swoją użyteczność oczekuje się, że w przyszłości staną się one jeszcze bardziej popularne. Nowe dostosowania biosensorów najprawdopodobniej będą obejmować ich modyfikacje i tworzenie chipów ulegających regeneracji, które można dostosować do dowolnej pożądanej funkcjonalności.

#### **4.2. [P2] Sulfonamides differing in the alkylamino substituent length – synthesis, electrochemical characteristic, acid-base profile and complexation properties**

W pracy [P2] przedstawiono wyniki badań wpływu długości łańcucha aminoalkilowego pochodnych sulfonamidowych na właściwości fizykochemiczne i kompleksotwórcze związków. Łączą one ze sobą chemię koordynacyjną trójwartościowych jonów rutenu i rodu z nowo zaprojektowanymi pochodnymi sulfonamidowymi o możliwym wykorzystaniu w farmaceutyce. Przeprowadzenie takich badań dla związków w kierunku zastosowań biologicznych jest niezwykle istotne dla zrozumienia sposobu ich działania, a także określenia najkorzystniejszych warunków osiągnięcia maksymalnego efektu farmaceutycznego.

Wykonano syntezę dwóch pochodnych sulfonamidowych różniących się długością łańcucha alifatycznego: 4-amino-N-(2-aminoetyl)benzenosulfonamidu (NethylS) oraz 4-amino-N-(3-aminopropyl)benzenosulfonamidu (NpropylS), a następnie potwierdzono ich strukturę z wykorzystaniem spektrometrii mas (MS), spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), analizy elementarnej oraz spektroskopii Fouriera w podczerwieni (FTIR). W dalszym etapie ustalono i opisano pełne profile elektrochemiczne badanych związków w środowisku protycznym i aprotycznym oraz zbadano wpływ zmiany pH na zachodzące w roztworze procesy redoks. Określono również profile spektroskopowe analitów, a co za tym idzie, ich wartości stałej dysocjacji kwasu  $pK_a$ , które opisują zachowanie sulfonamidów w rozpuszczalniku. Dzięki temu, możliwe jest określenie zdolności związków do przenikania przez błony komórkowe oraz identyfikację jego protolitycznej postaci w środowisku wewnątrzkomórkowym. Ponadto określono stałe trwałości tworzenia związków koordynacyjnych z jonami Ru(III) i Rh(III), co pozwala na zdefiniowanie preferowanego ułożenia przestrzennego utworzonych kompleksów.

Przeprowadzone pomiary elektrochemiczne zostały wykonane w środowisku protycznym ( $H_2O$ ) oraz aprotycznym (DMSO). Środowisko wodne występuje w organizmie prawie we wszystkich molekułach. Warto jednak zaznaczyć, że m.in. w błonach komórkowych lub enzymach, których wartości  $pK_a$  różnią się znacznie od wartości w wodzie może występować środowisko lokalne ze względu na większy charakter lipofilowy tych indywiduów. W związku z tym, prowadzenie badań w warunkach niewodnych może odzwierciedlać zachowanie związku w układach biologicznych [151,152].

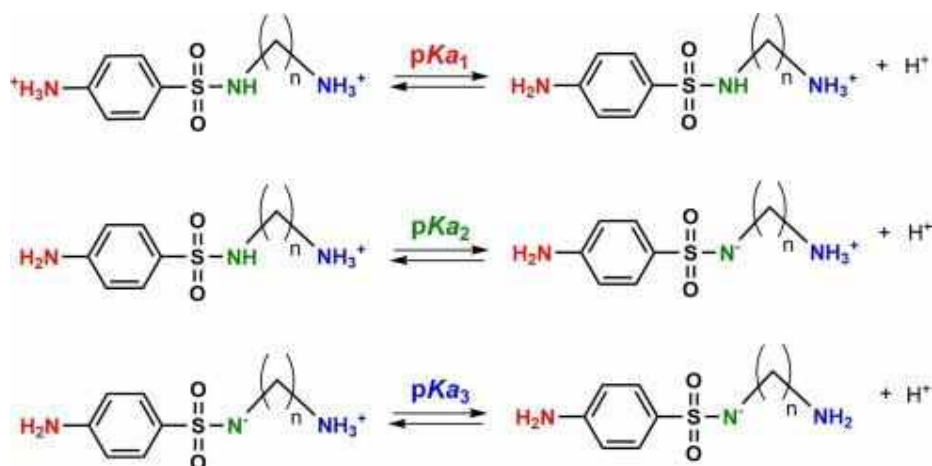
Na zarejestrowanych woltamperogramach cyklicznych (CV) (**Rysunek 2 w [P2]**) w rozpuszczalniku aprotycznym (DMSO) dla obu związków (NethylS i NpropylS) obserwuje się dwa piki utlenienia. Dla związku NethylS występują one przy niższych wartościach potencjału ( $E_{a1} = 0,840$  V,  $E_{a2} = 1,315$  V) niż dla związku NpropylS ( $E_{a1} = 0,924$  V,  $E_{a2} = 1,433$  V). Zjawisko to świadczy o łatwiejszym utlenianiu pochodnej z łańcuchem etylowym w podstawniku. Szybkość pomiaru ma decydujący wpływ na powstanie piku  $E_{a1}$ , który jest niewidoczny przy bardzo małych szybkościach skanowania (10–25 mV/s) dla obu badanych związków, natomiast przy szybkościach większych niż 100 mV/s staje się szeroki i rozmyty dla NethylS. Związek NpropylS charakteryzuje się wyraźniejszymi i intensywniejszymi pikami. W przypadku roztworów wodnych dla obu związków widoczny jest jedynie jeden sygnał utlenienia, który dla związku NethylS występuje przy niższych wartościach potencjału ( $E_{a1} = 0,973$  V) niż w przypadku związku NpropylS ( $E_{a1} = 1,094$  V). Sugeruje to, że proces utleniania zachodzi łatwiej dla związku z krótszym łańcuchem alifatycznym. Dla obu ligandów zarówno w środowisku protycznym i aprotycznym wraz ze wzrostem szybkości rejestrowania pomiaru (od 10 mV/s do 300 mV/s) obserwuje się wzrost intensywności sygnałów, przy jego jednoczesnym przesunięciu w stronę bardziej dodatnich potencjałów. Dla obu związków zarejestrowano także woltamperogramy pulsowe różnicowe (DPV) (**Rysunek 2 w [P2]**) w DMSO i wodzie. W każdym przypadku zaobserwowano sygnał prądowy, którego wartość potencjału była zgodna z pomiarami CV.

W celu określenia wpływu środowiska na procesy redoks badanych sulfonamidów oraz powiązania efektów elektrochemicznych z ich kwasowo-zasadowym charakterem rejestrowano woltamperogramy CV i DPV wodnych roztworów NethylS i NpropylS przy różnych wartościach pH. Zrozumienie właściwości kwasowo-zasadowych ligandów jest niezbędne do opisanie ich zachowania w rozpuszczalniku. Pomiary wykonywano w roztworze wodnym w zakresie pH od 2,80 do 11,56. Roztwory pochodnych sulfonamidowych miały pH 3,69 dla NethylS i 3,86 dla NpropylS, do których dodawano porcję 0,1 M kwasu lub 0,1 M zasady. Wyniki zostały przedstawione na **Rysunku 3 w [P2]**. Niskie początkowe wartości pH roztworów związków wynikają z ich postaci chlorowodorkowej. Dodatkowe zakwaszenie mieszaniny nie zmieniło położenia, ani intensywności sygnałów w porównaniu z początkowymi roztworami analizowanych związków. Dla badanych sulfonamidów zarejestrowanych w najbardziej

kwasowym środowisku zaobserwowano dobrze ukształtowane, intensywne, pojedyncze piki utleniania, zlokalizowane w pobliżu wartości potencjału 1 V. Sygnały te są widoczne na zarówno na woltamperogramach CV, jak i DPV, jednak w drugim przypadku obserwuje się bardziej widoczne zmiany. Prowadzą one do zmniejszenia natężenia (wartości prądu) sygnałów, a w pH zasadowym także do pojawienia się szerokich pików przy niższych wartościach potencjałów (w zakresie ok. 0,6 V – 0,8 V). Świadczy to o istotnym wpływie zasadowego pH na przebieg zachodzących procesów redoks.

Do opisanie właściwości spektroskopowych pochodnych sulfonamidowych i określenia warunków miareczkowania kwasowo-zasadowego, zarejestrowano ich widma absorpcji. Ponadto wykonano to samo badanie po dodaniu do analizowanego roztworu kwasu i zasady w celu sprawdzenia wpływu zmiany środowiska na kształt i intensywność maksimów. Omawiane sulfonamidy posiadają maksima absorpcji przy długości fali 262 nm dla NethylS i 261 nm dla NpropylS, których położenie nie uległo zmianie po dodaniu kwasu. Maksima obu związków przesunęły się jednak w stronę krótszych długości pod wpływem zasady (przesunięcie hipsokromowe). Dla NethylS przesunięcie to było silniejsze ( $\Delta\lambda = 5$  nm) i łączyło się z efektem hipochromowym. Niemniej jednak w przypadku NpropylS przesunięcie w stronę błękitu było bardziej subtelne ( $\Delta\lambda = 2$  nm) i nie zmniejszało intensywności pasma.

Stała dysocjacji kwasu dostarcza informacji o formie protolitycznej w roztworze. W celu wyznaczenia wartości  $pK_a$  badanych związków, należy określić model i liczbę równowag występujących w roztworze podczas miareczkowania pH-spektrofotometrycznego. Z zebranych danych eksperymentalnych wykreślono A-diagramy (**Rysunek 5 i 6 w [P2]**), czyli wykresy przedstawiające wzajemne zmiany absorbancji przy dwóch różnych długościach fali oraz zależności zmiany absorbancji (A) w funkcji pH. Na tej podstawie określono liczbę równowag w roztworze dla analizowanego związku (**Rysunek 9**). Wykazano obecność trzech równowag w roztworze, o czym świadczy obecność trzech segmentów na A-diagramie i taka sama liczba przebiegów na wykresie zależności absorbancji (A) w funkcji pH. Obliczone wartości  $pK_a$  dla związków NethylS i NpropylS przedstawiono w **Tabeli 3**.



**Rysunek 9.** Reakcje równowag dysocjacji związku NethylS ( $n = 2$ ) i NpropylS ( $n = 3$ ) (oryginalny rysunek nr 4 z publikacji [P2], praca Open Access – zgoda na wykorzystanie nie jest wymagana)

**Tabela 3.** Wartości długości fali przy maksimum absorpcji ( $\lambda_{\text{max}}$ ), wartości molowego współczynnika absorpcji ( $\epsilon$ ) oraz wartości stałej dysocjacji kwasu ( $\text{pK}_a$ ) (z odchyleniem standardowym) (tabela nr 2 z publikacji [P2], przetłumaczona na język polski, praca Open Access – zgoda na wykorzystanie nie jest wymagana).

Nazwa związku	$\lambda_{\text{max}}$ [nm]	$\epsilon$ dla $\lambda_{\text{max}}$ [ $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]	$\lambda_{\text{max}}$ [nm] (dodatek kwasu)	$\lambda_{\text{max}}$ [nm] (dodatek zasady)	$\text{pK}_{a1}$	$\text{pK}_{a2}$	$\text{pK}_{a3}$
NethylS	262	16,830	262	257	2,62 $\pm 0,19$	6,45 $\pm$ 0,21	9,67 $\pm$ 0,08
NpropylS	261	17,080	261	259	2,11 $\pm 0,10$	6,35 $\pm$ 0,06	10,86 $\pm$ 0,19

W przypadku badanych w pracy [P2] sulfonamidów wartości  $\text{pK}_{a1}$  związane z grupą aminową ugrupowania sulfonamidowego wynoszą około 2. Jeśli chodzi o reakcję dysocjacji grupy amidowej, wartości  $\text{pK}_{a2}$  wahają się od 5,5 do 7,7 w zależności od budowy podstawnika. Uzyskane z eksperymentu wyniki mieszczą się w zakresach typowych dla tej grupy związków [153,154]. Struktura podstawnika alkiloaminowego ma kluczowe znaczenie dla zasadowości cząsteczki, a jego długość powoduje zwiększenie odległości grupy aminowej od reszty cząsteczki, co powoduje wzrost zasadowości z obrębie tej grupy. W związku z tym wartość  $\text{pK}_{a3}$  jest mniejsza w przypadku związku NethylS ( $\text{pK}_{a3} = 9,67$ ), niż dla związku NpropylS ( $\text{pK}_{a3} = 10,86$ ). Ponadto, konsekwencją

większej odległości pomiędzy grupami aminowymi N1 i N3 (**Rysunek 7**) jest niższa wartość  $pK_{a1}$  dla pochodnej z łańcuchem propylowym ( $pK_{a1} = 2,62$  dla NethylS;  $pK_{a1} = 2,11$  dla NpropylS).

Ostatnim etapem badań była analiza właściwości kompleksotwórczych jonów Ru(III) i Rh(III) z pochodnymi sulfonamidowymi. Z uwagi na to, że ligandy NethylS i NpropylS zostały zsyntezowane w postaci dichlorowodoroków, a co za tym idzie ich atomy donorowe są sprotonowane, znacząco utrudnia to lub całkowicie uniemożliwia proces kompleksowania jonów metali. W związku z tym, konieczne było ich aktywowanie poprzez deprotonację wraz z dodatkiem KOH podczas miareczkowania. Procesowi kompleksowania towarzyszyło odbarwianie roztworów. Przeprowadzone miareczkowania potencjometryczne umożliwiły ocenę stechiometrii otrzymanych jonów zespolonych oraz obliczenie wartości stałych stabilności. Na podstawie uzyskanych danych, wyznaczono wartości stałych trwałości utworzonych kompleksów (**Rysunek 7 w [P2]**).

W związku z tym, że jony metali koordynują się sekwencyjnie z ligandami, w roztworze z pewnością obecne są formy kompleksu ML o stechiometrii 1:1, stąd obliczono wartość stopniowej stałej tworzenia  $K_{11}$ , opisując tę równowagę. Zaobserwowano także obecność drugiej stopniowej równowagi tworzenia (oznaczoną stałą  $K_{12}$ ), związaną z przyłączeniem drugiego ligandu sulfonamidowego i utworzeniem kompleksu  $ML_2$ . Na podstawie zależności pomiędzy stopniową i sumaryczną stałą trwałości wyznaczono także wartości  $\beta_{12}$ . Wszystkie obliczone wartości stałych stabilności zebrano w **Tabeli 4**.

**Tabela 4.** Wartości stopniowych stałych trwałości ( $K_{11}$  i  $K_{12}$ ) oraz sumarycznej stałej trwałości  $\beta_{12}$  związków kompleksowych Ru(III) i Rh(III) z pochodnymi sulfonamidowymi NethylS i NpropylS (z odchyleniem standardowym)(tabela nr 3 z publikacji [P2], przetłumaczona na język polski, praca Open Access – zgoda na wykorzystanie nie jest wymagana).

Nazwa związku	Rh <sup>3+</sup>			Ru <sup>3+</sup>		
	log $K_{11}$	log $K_{12}$	log $\beta_{12}$	log $K_{11}$	log $K_{12}$	log $\beta_{12}$
NethylS	6,85 ± 1,64	11,36 ± 1,59	18,21	6,35 ± 0,62	12,08 ± 0,53	18,43
NpropylS	8,78 ± 0,88	10,74 ± 0,83	19,51	5,90 ± 1,98	7,29 ± 1,66	13,19

\*  $\log\beta_{12} = \log K_{11} + \log K_{12}$



Dla wszystkich badanych form koordynacyjnych wartość  $K_{12}$  jest większa od wartości  $K_{11}$ , co potwierdza tworzenie stabilnych połączeń, których stechiometria M:L została określona jako 1:2 ( $ML_2$ ). W przypadku kompleksów z jonem Rh(III) wartość kumulatywnej stałej stabilności obserwuje się wyższą dla ligandu NpropylS ( $\log\beta_{12} = 19,51$ ), niż NethylS ( $\log\beta_{12} = 18,21$ ). W przypadku form koordynacyjnych z jonami Ru(III) można zaobserwować zasadnicze różnice w wartościach stopniowej stałej  $K_{12}$ . Dla ligandu NethylS wartość ta wynosi 12,08, natomiast dla NpropylS – 7,29, co wskazuje na mniejszą stabilność kompleksu stechiometrycznego  $ML_2$  NpropylS z jonami Ru(III). Przekłada się to również na wyższą wartość skumulowanej stałej stabilności ( $\log\beta_{12} = 18,43$ ) w przypadku oddziaływania Ru(III) z ligandem NethylS.

Sulfonamidy mogą koordynować jony metali na różne sposoby, takie jak:

- chelatowanie przez atom azotu z podstawnika i atom tlenu grupy  $-SO_2NH-$  [25];
- chelatowanie przez atom azotu z podstawnika i atom azotu ugrupowania  $-SO_2NH-$  [155];
- chelatowanie przez atom azotu grupy anilinowej  $-NH_2$  i atom azotu ugrupowania  $-SO_2NH-$  [156];
- chelatowanie zarówno atomu O, jak i atomu N z grupy  $-SO_2NH-$  [157];
- koordynacja poprzez atom N podstawnika pierścienia heterocyklicznego [158].

W przypadku badanych ligandów atomami donorowymi, które mogą brać udział w kompleksowaniu jonów metali, są atomy azotu (głównie N2 i N3, rzadziej N1) (*Rysunek 7*) i ewentualnie atom tlenu grupy  $-SO_2NH-$ . Elastyczna struktura podstawnika alkiloaminowego i konieczność aktywacji ligandu przez deprotonację w celu skompleksowania sugerują, że kationy metali są koordynowane przez atomy azotu N2 i N3. Zaproponowany sposób koordynacji prowadzi do powstania w wyniku chelatacji stabilnych pierścieni pięcioczłonowych (w przypadku NethylS) lub sześcioczłonowych (w przypadku NpropylS). Uzyskane wartości kumulatywnych stałych stabilności wskazują, że w przypadku jonów rodu(III) bardziej uprzywilejowaną formą kompleksu jest sześcioczłonowy pierścień chelatowy (z ligandem NpropylS), natomiast jon rutenu(III) preferuje utworzenie pięcioczłonowego pierścienia poprzez kompleksowanie z NethylS.

Reasumując, pomiary elektrochemiczne wykazały obecność pików utleniania dla badanych związków sulfonamidowych, zarówno w wodzie, jak i w rozpuszczalniku

aprotocznym. Zachodzące procesy redoks były zależne od pH, jednak nie zaobserwowano istotnego wpływu szybkości procesów na ich przebieg. Związek NpropylS charakteryzował się wyraźniejszymi i intensywniejszymi pikami niż pochodna z krótszym łańcuchem w podstawniku (NethylS).

Wyniki miareczkowania potencjometrycznego wykazały istnienie trzech równowag dysocjacji w roztworach badanych ligandów, co jest zgodne z obecnością trzech centrów kwasowo-zasadowych w obu cząsteczkach. Wyznaczone wartości stałych  $pK_{a1}$  i  $pK_{a2}$  są zgodne z danymi literaturowymi dotyczącymi pochodnych sulfonamidowych. Struktura podstawnika przyłączonego do grupy aminowej ma kluczowe znaczenie dla zasadowości całej cząsteczki. Wykazano, że niewielka różnica w budowie badanych pochodnych, jak jednostka  $-CH_2-$  w podstawniku R, wpływa na wartości stałej  $pK_a$  opisującej dysocjację kolejnych protonów. Zwiększanie długości łańcucha w podstawniku powoduje wzrost zasadowości grupy aminowej atomu azotu N3, w efekcie czego zmniejsza się także wartość  $pK_a$  odpowiadająca grupie aminowej (N1), niezależnie od odległości oddzielającej dwa centra kwasowo-zasadowe.

Badania właściwości kompleksotwórczych wykazały tworzenie się związków koordynacyjnych charakteryzujących się wysokimi wartościami stałych trwałości z jonami rodu(III) i rutenu(III). Dla obu jonów metali stechiometrię M:L form koordynacyjnych zdefiniowano jako 1:2 ( $ML_2$ ). Kompleksowanie jonów przez badane sulfonamidy może prowadzić do powstania pierścieni chelatowych o różnej wielkości, w zależności od długości podstawnika alkiloaminowego biorącego udział w procesie koordynacji. Z naszych badań wynika, że w przypadku jonu rodu(III) preferowaną formą kompleksu jest sześcioczłonowy pierścień chelatowy z ligandem NpropylS, natomiast w przypadku jonów rutenu(III) preferowany jest pierścień pięcioczłonowy z ligandem NethylS.

Informacja o profilu fizykochemicznym i właściwościach kompleksotwórczych badanych ligandów jest kluczowa dla dalszych badań tych układów. Mniejsza stabilność kompleksu NpropylS z jonami Ru(III) nie wyklucza go jako kandydata na skuteczny farmaceutyk. W przypadku związków kompleksowych o działaniu biologicznym związek musi wykazywać się wystarczająco dużą stabilnością, aby w skoordynowanej formie mógł dotrzeć do celu molekularnego. Z drugiej strony, pożądana jest również labilność takiego układu, aby umożliwić uwolnienie zarówno cząsteczek wolnych ligandów, jak i jonów metali w miejscu działania leku [159,160].

### **4.3. [P3] Application of the SwitchSense Technique for the Study of Small Molecules' (Ethidium Bromide and Selected Sulfonamide Derivatives) Affinity to DNA in Real Time**

Przedstawione w pracy [P3] badania miały na celu określenie sposobu wiązania i siły oddziaływania związków niskocząsteczkowych z łańcuchem DNA. Wykonane analizy były pomocne w określeniu powinowactwa analizowanych struktur do wybranej sekwencji dwuniciowego DNA oraz szybkości zachodzącego procesu asocjacji i dysocjacji. Ponadto wyznaczono wartości stałej wiązania adduktu DNA–analit. Wyniki badań switchSENSE zostały uzupełnione analizą dokowania molekularnego. Dzięki niemu omówiono możliwy tryb i miejsca wiązania badanych związków z konkretną sekwencją par zasad.

Badania z wykorzystaniem techniki switchSENSE rozpoczęto od analizy oddziaływania interkalatora – bromku etydydy (EB) z łańcuchem DNA. EB charakteryzuje się wysoką wartością stałej wiązania z DNA, a termodynamiczna charakterystyka wiązania z tą biomolekułą została dobrze opisana z wykorzystaniem innych eksperymentów [161,162]. Głównym obiektem analizy były sulfonamidy ze względu na udowodnioną aktywność przeciwbakteryjną i przeciwnowotworową [72,82,95–98]. Jednym z nich był sulfatiazol (STZ) wykazujący działanie bakteriostatyczne. Jego oddziaływanie z DNA w roztworach zostało wcześniej określone przez członków Katedry Chemii Bionieorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego za pomocą miareczkowania spektrofotometrycznego [25]. Kolejnymi obiektami badawczymi były dwie pochodne sulfonamidowe, różniące się długością łańcucha sulfonamidowego: 4-amino-N-(2-aminoetylo)benzenosulfonamid (NethylS) i 4-amino-N-(2-aminopropylo)benzenosulfonamid (NpropylS), których syntezę i właściwości fizykochemiczne opisano w publikacji [P2].

W dalszej części artykułu przedstawiono i przedyskutowano otrzymane wyniki dotyczące związku EB. W literaturze pojawiają się odniesienia wskazujące na interkalację omawianego związku do helisy DNA poprzez oddziaływanie z sekwencjami guanina–cytozyna [163] oraz adenina–tymina [164]. Interkalacja jest wynikiem oddziaływania hydrofobowego, podczas którego cząsteczka aromatyczna zostaje przyciągana do niepolarnego środowiska par zasad z hydrofilowego otoczenia wodnego [165].

Uzyskane wyniki dokowania molekularnego (*Rysunek 2 w [P3]*) pozwoliły na określenie najkorzystniejszych miejsc wiązania EB. Znajdują się one w dolnej części badanej helisy DNA, tj. w części znajdującej się bliżej kotwicy umieszczonej na chipie. Wykonana analiza pozwoliła na określenie najbardziej popularnych oraz najsilniejszych miejsc oddziaływania EB. Oba te oddziaływania cząsteczki z helisą DNA zachodzą zazwyczaj w tym samym, mniejszym rowku, w którym dominuje obecność par adenina–tymina. Ponadto wyznaczono kolejne dwa najpopularniejsze miejsca wiązania związku, które znajdują się w pierwszym mniejszym rowku, w którym nie dominuje żadna konkretna para zasad, ponieważ zakotwiczony fragment helisy zaczyna się od sekwencji TAG TGC. Otrzymane wyniki dokowania molekularnego sugerują występowanie dużego powinowactwa bromku etydyny do adeniny oraz tyminy. W dalszej części badań teoretycznych wykonano dokładniejsze obliczenia dla adduktu EB–DNA w konkretnym rowku. Dzięki temu wykazano, że najpopularniejszym sposobem wiązania bromku etydyny jest jego prostopadłe ułożenie do mniejszego rowka helisy DNA. Najsilniejsze oddziaływanie natomiast zachodzi poprzez zaciśnięcie pierścieni na jednej z par zasad nukleinowych tworzących mniejszy rowek. Podobne konkluzje dotyczące sposobu wiązania EB z biomolekułą DNA poprzez oddziaływanie z parą zasad adenina–tymina zostały już wcześniej opisane w literaturze [164,166], co potwierdza słuszność tej tezy.

Uzyskane z obliczeń teoretycznych wyniki wskazują na występowanie interkalacji bromku etydyny do helisy DNA. Podobny wniosek można otrzymać z danych eksperymentalnych porównując wartości stałej asocjacji ( $K_A$ ), które są wysokie (rzędu  $10^4$ – $10^6$   $M^{-1}$ ) dla tego rodzaju oddziaływania. Znane w literaturze stałe wiązania dla adduktu DNA–EB różnią się nieznacznie wartościami w zależności od zastosowanej techniki pomiarowej i wynoszą około  $10^5$ – $10^6$   $M^{-1}$  [162,167,168].

Badania dotyczące tworzenia adduktu EB–DNA z wykorzystaniem techniki switchSENSE przeprowadzono w dwóch trybach: dynamicznym i statycznym (w tym przypadku zastosowano dwie metody – słabych wiązań i kinetykę standardową). Na uzyskanych wykresach (*Rysunek 4 w [P3]*), dla wszystkich mierzonych wariantów, widoczne są krzywe odpowiadające za procesy asocjacji i dysocjacji. Podczas stosowania trybu dynamicznego wyniki były niezadowolające, przez co odrzucono zastosowanie tej metody w wykonywanych badaniach, z uwagi na:

- brak występowania korelacji pomiędzy stężeniem analitu, a intensywnością zmian fluorescencji;
- niepowtarzalność uzyskanych wyników;
- błędy w obliczeniach szybkości asocjacji i dysocjacji oraz stałej wiązania ( $K_A$ ), na co wskazują wysokie wartości odchyłeń standardowych.

Dzięki wykonanym pomiarom w trybie statycznym z wykorzystaniem metody kinetyki standardowej, można zaobserwować wyraźną krzywą odpowiadającą zachodzącemu procesowi asocjacji. Świadczy to o krótkim czasie tworzenia się adduktu EB–DNA. Następnie przez jedną minutę, na wykresie widoczna jest linia prosta utrzymująca się na stałym poziomie intensywności fluorescencji. Zjawisko to świadczy o tym, że wszystkie helisy DNA związały się z analitem. Po upływie 90 sekund rozpoczął się proces dysocjacji poprzez przemywanie powierzchni chipu buforem. Obserwuje się w tym momencie spadek intensywności zmian fluorescencji do wartości początkowych. Powstała krzywa odpowiada za proces dysocjacji i jest mniej ostra, niż w przypadku asocjacji. Sugeruje to tworzenie silnego wiązania EB z helisą DNA. W końcowej fazie wykresu można zaobserwować wypłaszczenie krzywej na poziomie zmian intensywności fluorescencji dążącej do 0, co świadczy o całkowitej dysocjacji cząsteczek analitu od nici DNA. Podobny kształt krzywych jest widoczny na wykresach uzyskanych z pomiaru wykorzystującego metodę słabych wiązań. W tym przypadku skrócono czas prowadzenia zarówno procesu asocjacji i dysocjacji w celu zoptymalizowania przebiegu analizy. Wyznaczone wartości szybkości  $k_a$  i  $k_d$  wraz ze stałymi  $K_A$  i  $K_D$  były powtarzalne (w trzech niezależnych doświadczeniach) i przedstawiono je w **Tabeli 5**.

Uzyskane wartości współczynników szybkości asocjacji ( $k_a$ ) sugerują wpływ temperatury na oddziaływanie związku. Wzrost temperatury otoczenia prostych układów o małej masie cząsteczkowej powoduje z reguły zwiększenie ich mobilności oraz reaktywności w roztworach. Analiza wartości  $k_a$  prowadzi do wniosku, że tendencja ta utrzymuje się w badanym przypadku dla temperatur z zakresu 25–37°C. W przypadku dużych układów (takich jak białka czy kwasy nukleinowe) temperatura wpływa w większym stopniu na konformację, a co za tym idzie na ich reaktywność, niż w przypadku małych cząsteczek [169,170]. Ponadto zaobserwowano przyspieszenie procesu asocjacji EB z DNA na skutek obniżenia temperatury (z 25 do 15°C). Może być to spowodowane faktem, że w 15°C DNA przyjmuje korzystną termodynamicznie

konfigurację, która pozwala na szybsze i silniejsze oddziaływanie z EB. Wyższa temperatura, powodująca zwiększone drgania i ruch cząsteczek, utrudnia utrzymanie wiązania. Warto również zaznaczyć, że wartości współczynników szybkości dysocjacji  $k_d$  nie różnią się znacząco w zależności od temperatury. Sugeruje to, że w tym procesie decyduje głównie przepływ buforu przez układ. Ponadto widoczne są różnice w wartościach stałej asocjacji ( $K_A$ ) i dysocjacji ( $K_D$ ) dla pomiarów zarejestrowanych w trzech różnych temperaturach, które wynikają głównie z wartości współczynników szybkości  $k_a$  i  $k_b$ . Uzyskane wyniki pomiaru z zastosowaniem metody kinetyki standardowej są zbliżone do wartości z analizy metodą słabych wiązań. Potwierdza to możliwość wykorzystania obu podtypów trybu statycznego do określenia parametrów kinetycznych oddziaływania bromku etydyny z DNA.

**Tabela 5.** Wartości (wraz z ich odchyleniami standardowymi) ustalonych szybkości asocjacji ( $k_a$ ), szybkości dysocjacji ( $k_d$ ), stałych asocjacji ( $K_A$ ) i stałych dysocjacji ( $K_D$ ) dla wiązania EB z helisą DNA w buforze PE140 (tabela nr 1 z publikacji [P3], przetłumaczona na język polski, praca Open Access – zgoda na wykorzystanie nie jest wymagana).

Tryb pracy	Temp. [°C]	$k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [M]	$K_A$ [ $M^{-1}$ ]
<b>Statyczna kinetyka standardowa (standard)</b>	15	$(1,50 \pm 0,16) \cdot 10^6$	$0,359 \pm 0,005$	$(2,39 \pm 0,25) \cdot 10^{-7}$	$(4,19 \pm 0,44) \cdot 10^6$
	25	$(6,98 \pm 0,63) \cdot 10^5$	$0,358 \pm 0,007$	$(5,13 \pm 0,47) \cdot 10^{-7}$	$(1,95 \pm 0,18) \cdot 10^6$
	37	$(8,55 \pm 0,95) \cdot 10^5$	$0,360 \pm 0,006$	$(4,22 \pm 0,47) \cdot 10^{-7}$	$(2,37 \pm 0,27) \cdot 10^6$
<b>Statyczna słabe wiązania (weak binders)</b>	15	$(1,69 \pm 0,20) \cdot 10^6$	$0,391 \pm 0,007$	$(2,32 \pm 0,27) \cdot 10^{-7}$	$(4,31 \pm 0,51) \cdot 10^6$
	25	$(6,04 \pm 0,18) \cdot 10^5$	$0,478 \pm 0,190$	$(7,91 \pm 0,45) \cdot 10^{-7}$	$(1,26 \pm 0,23) \cdot 10^6$
	37	$(1,03 \pm 0,19) \cdot 10^6$	$0,388 \pm 0,008$	$(3,75 \pm 0,69) \cdot 10^{-7}$	$(2,67 \pm 0,49) \cdot 10^6$

Środowisko, w którym zachodzi proces asocjacji może mieć wpływ na tworzenie się adduktu analitu z helisą DNA. Ponadto udowodniono wpływ różnych sił jonowych na konformację cząsteczek DNA połączonych końcami z powierzchnią chipu [169]. W przypadku analizy związku EB w buforze PE140 zastosowano zakres stężeń od  $10^{-6}$  do  $10^{-8}$  M, który powodował zmiany fluorescencji na poziomie

od około 2 do 30%. Były to parametry najkorzystniejsze dla pomiarów. Zbyt małe zmiany fluorescencji (poniżej około 1%) mogą prowadzić do uzyskania wartości parametrów kinetycznych o dużym odchyleniu standardowym. Doświadczenie zostało powtórzone z wykorzystaniem buforu PE40. Na otrzymanych wykresach (**Rysunek 5 w [P3]**) widoczny jest wzrost aktywności fluoroforu, a zmiany intensywności fluorescencji utrzymują się w zakresie od 2 do 70%. Bufor PE40 charakteryzuje się niższym stężeniem NaCl (mniejszą siłą jonową) w porównaniu do buforu PE140, jednak w obu przypadkach wartości  $K_A$  dla zachodzącego procesu są porównywalne ( $K_{A \text{ w PE140}} = (1,95 \pm 0,18) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ;  $K_{A \text{ w PE40}} = (1,52 \pm 0,15) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). W związku z tym, zwiększanie intensywności odpowiedzi fluoroforu poprzez odpowiedni dobór buforu może być korzystne w przypadku związków, których wiązanie z DNA powoduje jedynie niewielkie zmiany we fluorescencji jednostki sygnalizacyjnej.

Podsumowując, wyniki badań dla bromku etydyny wskazują, że metoda dynamiczna nie jest odpowiednia (niewystarczająco czuła) do badania oddziaływań związków małocząsteczkowych z helisą kwasu nukleinowego. Dzięki zastosowaniu trybu statycznego uzyskano:

- korelację pomiędzy stężeniem analitu, a intensywnością zmian fluorescencji;
- powtarzalność uzyskanych wyników;
- wartości wyznaczonych współczynników szybkości dla procesów asocjacji ( $k_a$ ) i dysocjacji ( $k_d$ ) oraz stałych  $K_A$  i  $K_D$  z ich niskimi odchyleniami standardowymi.

Dzięki zastosowaniu techniki switchSENSE i dokowania molekularnego określono kinetykę procesu asocjacji i dysocjacji adduktu EB–DNA oraz sposobu wiązania analizu z biomolekułą.

Kolejnym związkiem niskocząsteczkowym poruszonym w artykule jest sulfatiazol (STZ). Jego oddziaływanie z helisą DNA nie zostało do tej pory szeroko opisane w literaturze. Dzięki analizie dokowania molekularnego (**Rysunek 2 w [P3]**) ustalono, że najkorzystniejsze miejsce wiązania znajduje się w pierwszym, mniejszym rowku. Jak wspomniano wcześniej, ten region podwójnej nici nie wykazuje żadnej specyficzności, ponieważ zakotwiczony na powierzchni chipu fragment helisy zaczyna się od sekwencji TAG TGC. Pozostałe dwa najbardziej preferowane sposoby wiązania sulfatiazolu znajdują się po drugiej stronie nici DNA, tj. w czwartym mniejszym rowku. Składa się on głównie z par adenina–tymina, co pokazuje, że preferencje sulfatiazolu

w stosunku do pewnych zasad nukleinowych można uznać za nieco podobne do preferencji EB. Najsilniejsze oddziaływanie obserwuje się w obrębie drugiego, mniejszego rowka. To miejsce jest zbudowane w przybliżonych ilościach par adenina–tymina i cytozyna–guanina. W związku z tym sekwencja (TCG), z której składa się ten rowek oraz jej najbliższe otoczenie tworzą istotne wiązanie z punktu widzenia trwałości układu. Dalsze obliczenia teoretyczne wskazały na ułożenie cząsteczki STZ równoległe do „podstawy” mniejszego rowka w najpopularniejszym miejscu wiązania. W najsilniejszym addukcie natomiast wykazano, że kąt dwuścienny CSNC w sulfatazolu wynosi  $164,91^\circ$ , co pozwala na uzyskanie większej powierzchni oddziaływania helisy DNA z cząsteczką.

Wyniki eksperymentów pokazują, że zmiany fluorescencji zaobserwowane dla STZ były znacznie mniejsze niż dla EB. Może to wynikać ze słabszego wiązania tego związku z DNA, powstawania oddziaływania w innym rowku helisy lub innego sposobu interakcji. W związku z tym niemożliwe było wyznaczenie parametrów  $k_a$ ,  $k_d$ ,  $K_A$  i  $K_D$  dla adduktu STZ–DNA. Otrzymane dane charakteryzowały się dużym odchyleniem standardowym przewyższającym wartość pomiaru.

Ostatnimi obiektami badawczymi opisanymi w artykule były dwie pochodne sulfonamidowe różniące się długością podstawnika alkiloaminowego (NethylS i NpropylS). W publikacji [P2] wykazano, że niewielka różnica w budowie obejmująca obecność dodatkowego wiązania  $-CH_2-$  wpływa na ich właściwości fizykochemiczne. W związku z tym, zbadano oddziaływania cząsteczek z biomolekułą DNA za pomocą techniki switchSENSE. Określenie stałej wiązania tych związków za pomocą powszechnie stosowanych technik, takich jak spektroskopia UV–VIS czy woltamperometria, okazało się bardzo problematyczne. W przypadku miareczkowania spektrofotometrycznego nie udało się wyznaczyć wartości  $K_A$  ze względu na występowanie maksimum absorpcji związków ( $\lambda_{NethylS/NpropylS} = 262 \text{ nm}$ ) przy tej samej długości fali, co w przypadku roztworu DNA ( $\lambda_{DNA} = 260 \text{ nm}$ ). Obserwowane zmiany nie pozwoliły na jednoznaczne określenie tworzenia się adduktu. Podczas miareczkowania wraz ze wzrostem stężenia DNA obserwowano wzrost intensywności maksimum absorpcji. Było to spowodowane nakładaniem się pasm ligandu i analitu, co uniemożliwiało określenie wiarygodnej wartości stałej wiązania. W przypadku badań elektrochemicznych ze względu na bardzo małe natężenie pików



prądowych badanych związków i jedynie niewielkie zmiany tych sygnałów podczas dodawania roztworu DNA nie było możliwe wyznaczenie stałej wiązania.

Przeprowadzone symulacje dokowania molekularnego (*Rysunek 7 w [P3]*) wykazały, że w przypadku NethylS najważniejsze miejsca wiązania znajdują się w drugim i trzecim rowku. Najsilniejsze oddziaływanie NethylS z helisą DNA występuje w drugim rowku, tak samo jak w przypadku EB i STZ. Podczas tego oddziaływania z DNA, budowa analitu pozwala na utworzenie wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego pomiędzy atomem H grupy  $-NH_2$  i atomem N grupy sulfonamidowej. Obserwuje się wtedy równoległe ułożenie NethylS do dwóch nici DNA. W przypadku najbardziej popularnego oddziaływania atomy H grupy  $-NH_2$  biorą udział w tworzeniu międzycząsteczkowych wiązań wodorowych z atomami tlenu grup fosforanowych, obu nici DNA.

Dla związku NpropylS dokowanie wykazało występowanie zarówno najsilniejszego, jak i najbardziej preferowanego oddziaływania z helisą w tym samym miejscu, czyli w drugim, mniejszym rowku. Pozostałe najbardziej popularne miejsca wiązania znajdują się w drugim i trzecim mniejszym rowku. Z symulacji dokowania molekularnego wynika, że zarówno NethylS, jak i NpropylS mają wysokie powinowactwo do tych samych części badanej helisy DNA, najprawdopodobniej ze względu na podobną budowę strukturalną. Ponadto wykazano, że pochodna sulfonamidowa z dłuższym łańcuchem alkiloaminowym wiąże się najsilniej z biomolekułą w porównaniu do innych analitów opisywanych w artykule. Podczas najsilniejszego oddziaływania kąt dwuścienny CSNC w związku NpropylS jest równy  $-134,8^\circ$ , a wszystkie jego atomy wodoru przyłączone do ugrupowań aminowych, tworzą wiązania z receptorem poprzez atomy tlenu grupy fosforanowej lub ugrupowanie dezoksyrybozy. Natomiast kąt CSNC w najczęstszych oddziaływaniach wynosi  $-28,5^\circ$ , co skutkuje kształtem przypominającym literę L całego sulfonamidu i wymusza mniej korzystne wiązanie z receptorem niż miało to miejsce w przypadku pierwszego rozważanego dokowania NpropylS. W efekcie tylko część atomów wodoru analitu bierze udział w wiązaniu wodorowym z receptorem.

Badania oddziaływań związków NethylS i NpropylS z użyciem techniki switchSENSE przeprowadzono w trybie statycznym w modelu słabych wiązań. Na uzyskanych wykresach (*Rysunek 6 w [P3]*) widoczny jest proces asocjacji, który zachodzi wolniej niż w przypadku bromku etydyny. Ponadto, nie obserwuje

się całkowitego oddysocjowania związku od helisy DNA. Na wykresach krzywa odpowiadająca procesowi dysocjacji nie wraca do początkowych wartości zmian fluorescencji. Świadczy to o silnym wiązaniu obu pochodnych sulfonamidowych z biomolekułą DNA. Uzyskane wartości stałych współczynników szybkości  $k_a$  i  $k_d$  oraz wiązania  $K_A$  i  $K_D$  przedstawiono w **Tabeli 6**.

Analiza wartości współczynników szybkości wiązania ( $k_a$ ) w przypadku obu związków prowadzi do wniosku, że wiązanie prezentowanych sulfonamidów do helisy następuje znacznie wolniej (około tysiąc razy) niż w przypadku bromku etydyny. Proces dysocjacji adduktów, opisywany wartością  $k_d$ , również zachodzi znacznie wolniej i nie jest on całkowity, nawet przy dużym przepływie buforu. Wyznaczone wartości stałych asocjacji ( $K_A$ ) mieszczą się w przedziale  $10^3$ – $10^4$   $M^{-1}$ , zatem można je uznać za stosunkowo niskie. Z drugiej jednak strony można zaobserwować dużą odporność powstałego adduktu na dysocjację spowodowaną przepływem buforu. Sugeruje to zupełnie inny sposób oddziaływania NethyS i NpropylS z łańcuchem DNA niż w przypadku EB.

**Tabela 6.** Wartości (wraz z ich odchyleniami standardowymi) ustalonych szybkości asocjacji ( $k_a$ ), szybkości dysocjacji ( $k_d$ ), stałych asocjacji ( $K_A$ ) i stałych dysocjacji ( $K_D$ ) dla wiązania pochodnych sulfonamidowych z helisą DNA w buforze PE40 (tabela nr 2 z publikacji [P3], przetłumaczona na język polski, praca Open Access – zgoda na wykorzystanie nie jest wymagana).

Związek	Temp. [°C]	$k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [M]	$K_A$ [ $M^{-1}$ ]
NethylS	15	$72,7 \pm 3,6$	$(1,23 \pm 0,04) \cdot 10^{-2}$	$(1,68 \pm 0,10) \cdot 10^{-4}$	$(5,94 \pm 0,35) \cdot 10^3$
	25	$77,7 \pm 3,7$	$(8,77 \pm 0,59) \cdot 10^{-3}$	$(1,13 \pm 0,29) \cdot 10^{-4}$	$(8,82 \pm 0,72) \cdot 10^3$
	37	$61,9 \pm 2,7$	$(1,57 \pm 0,04) \cdot 10^{-3}$	$(2,54 \pm 0,13) \cdot 10^{-3}$	$(3,93 \pm 0,20) \cdot 10^3$
NpropylS	15	$26,7 \pm 3,4$	$(1,48 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$	$(5,53 \pm 0,73) \cdot 10^{-4}$	$(1,81 \pm 0,24) \cdot 10^3$
	25	$16,9 \pm 0,5$	$(1,02 \pm 0,02) \cdot 10^{-2}$	$(6,02 \pm 0,24) \cdot 10^{-4}$	$(1,66 \pm 0,07) \cdot 10^3$
	37	$15,4 \pm 0,6$	$(1,19 \pm 0,02) \cdot 10^{-2}$	$(7,73 \pm 0,34) \cdot 10^{-4}$	$(1,29 \pm 0,06) \cdot 10^3$

Reasumując, w niniejszej pracy przedstawiono zastosowanie i optymalizację techniki switchSENSE do badania oddziaływań małych cząsteczek z helisą DNA. Technika ta dominuje nad innymi powszechnie stosowanymi metodami badania takich

wiązań, ponieważ umożliwia pomiary w czasie rzeczywistym i jest stosunkowo tania. W doświadczeniach przeprowadzonych z bromkiem etydyny zmiany fluorescencji były duże, co potwierdza tworzenie adduktu EB–DNA oraz proces dysocjacji. Badania powtórzone (co najmniej trzykrotnie) i otrzymano stałe dysocjacji i asocjacji o dopuszczalnych wartościach odchylenia standardowego. Ponadto, dzięki przeprowadzonej symulacji dokowania molekularnego dowiedziono, że tworzenie najpopularniejszego i najkorzystniejszego wiązania EB zachodzi w drugim, mniejszym rowku helisy DNA. EB wykazało znaczne powinowactwo do par AT, które są liczne we wspomnianym rowku. Niestety technika switchSENSE jest ograniczona, co zaobserwowano w przypadku drugiego analizowanego związku, sulfatiazolu, dla którego wiązanie z DNA powodowało niewielkie zmiany w sygnale fluoroforu. W tym przypadku przeprowadzone eksperymenty pozwoliły stwierdzić, że choć STZ oddziałuje z DNA, to uzyskane wartości stałych asocjacji i dysocjacji obciążone są istotnymi błędami. W przypadku STZ najkorzystniejsze miejsce dokowania znajdowało się w pierwszym mniejszym rowku (od strony kotwicy). Ustalono jednak, że STZ najsilniej wiąże się z badanym DNA w obrębie drugiego mniejszego rowka. Stwierdzono również, że średnia energia wiązania związek–DNA w EB była wyższa niż w STZ, co może wyjaśniać wyniki przeprowadzonych eksperymentów dla układu DNA–STZ. Wyniki badań uzyskane dla NethylS i NpropylS okazały się zarówno przekonujące, jak i obiecujące. Wykazano, że oba te związki wiążą się z helisą DNA dość wolno, jednak powstający w tym procesie addukt jest stabilny i odporny na dysocjację wymuszoną przepływem buforu. Może to być spowodowane tworzeniem się wiązań wodorowych w wyniku oddziaływania z DNA. Na podstawie poruszonych w artykule doświadczeń można stwierdzić, że technika switchSENSE stanowi alternatywę dla stosowanych wcześniej metod badania wiązania związków niskocząsteczkowych z DNA.

#### **4.4. [P4] Theoretical study of the alkylamino-substituted sulfonamides with potential biological activity**

W pracy [P4] opisano właściwości fizykochemiczne pięciu pochodnych sulfonamidowych, różniących się długością łańcucha aminoalkilowego z wykorzystaniem metod obliczeniowych, które zostały porównane z danymi uzyskanymi eksperymentalnie. Obiektem analiz były następujące związki:

- 4-amino-N-(2-aminoetylo)benzenosulfonamid – NethylS;
- 4-amino-N-(2-aminopropylo)benzenosulfonamid – NpropylS;
- 4-amino-N-(2-aminobutylo)benzenosulfonamid – NbutylS;
- 4-amino-N-(2-aminopentylo)benzenosulfonamid – NpentylS;
- 4-amino-N-(2-aminoheksylo)benzenosulfonamid – NhexylS.

Ugrupowanie alkiloaminowe występuje w różnych lekach wykazujących szeroki zakres działania, takich jak środek przeciwgruźliczy w Ethambutolu [171] lub środek przeciwastmatyczny w Aminofilinie [172]. Przedstawione w omawianym artykule parametry są kluczowe dla prawidłowej oceny aktywności analizowanych sulfonamidów. Wykonana analiza dostarcza różnic strukturalnych i energetycznych między badanymi cząsteczkami i ich izomerami, równowagi kwasowo-zasadowej, wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych i hydrofobowości.

Budowa geometryczna leków sulfonamidowych determinuje ich reaktywność biologiczną, ponieważ może wpływać na wiązanie związku z receptorem. Różnice w energiach elektronowych (lub energiach swobodnych Gibbsa) pomiędzy izomerami regulują populację każdego izomeru w danych warunkach. Stan sprotonowania natomiast, poza wpływem na aktywność, wpływa na przenikanie przez błony w organizmie człowieka. Wartości  $pK_a$  pozwalają przewidzieć formę protonową leku na każdym etapie szlaku metabolicznego. Kolejnym ważnym czynnikiem wpływającym na reaktywność jest współczynnik podziału (wyrażony tutaj wartością  $\log P$ ), który pozwala ocenić dystrybucję danego leku w organizmie. Z kolei badanie wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego daje wgląd zarówno w kwasowość, jak i hydrofobowość badanych związków.

W celu poszerzenia doświadczenia badania rozpoczęto od syntezy związku NbutylS, a następnie potwierdzono jego strukturę. W dalszej części określono właściwości kwasowo-zasadowe związku z wykorzystaniem miareczkowania

spektrofotometrycznego (*Rysunek 4 w [P4]*). Maksimum absorpcji dla pochodnej sulfonamidowej znajduje się przy długości fali 261 nm, którego położenie nie zmienia się po dodaniu kwasu. Wartość ta zmieniła się nieznacznie po dodaniu roztworu zasady. Maksimum absorpcji tej mieszaniny znajduje się przy długości fali 260 nm. Na początku miareczkowania obserwuje się efekt hiperchromowy, co wraz z dodatkiem zasady powoduje efektem hipochromowy połączonym z przesunięciem hipschromowym. Na podstawie zebranych danych eksperymentalnych wykreślono A-diagram, czyli wykres przedstawiający zmiany absorbancji przy dwóch różnych długościach fali oraz zależności zmiany absorbancji (A) w funkcji pH. Na tej podstawie określono liczbę równowag w roztworze dla analizowanego związku. Wykazano obecność trzech równowag w roztworze, o czym świadczy obecność trzech segmentów na A-diagramie i taka sama liczba przegięć na wykresie zależności absorbancji (A) w funkcji pH. Uzyskane wyniki są spójne z przeprowadzonymi wcześniej badaniami opisanymi w publikacji [P2]. Obliczone wartości  $pK_a$  dla związku NbutylS przedstawiono w *Tabeli 7*.

*Tabela 7. Wartości długości fali przy maksimum absorpcji ( $\lambda_{max}$ ) oraz wartości stałej dysocjacji kwasu ( $pK_a$ ) (z odchyleniem standardowym) (tabela nr 1 z publikacji [P4], przetłumaczona na język polski, praca Open Access – zgoda na wykorzystanie nie jest wymagana).*

Nazwa związku	$\lambda_{max}$ [nm]	$\lambda_{max}$ [nm] (dodatek kwasu)	$\lambda_{max}$ [nm] (dodatek zasady)	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$
NbutylS	261	261	260	$1,76 \pm 0,07$	$4,51 \pm 0,14$	$12,28 \pm 0,04$

Struktura podstawnika alkiloaminowego ma kluczowe znaczenie dla zasadowości cząsteczki, a jego długość powoduje zwiększenie odległości grupy aminowej od reszty cząsteczki, co wpływa na wzrost zasadowości w obrębie tej grupy. W związku z tym obserwuje się wysoką wartość  $pK_{a3}$  w porównaniu do wcześniej analizowanych pochodnych sulfonamidowych NethylS i NpropylS opisanych w publikacji [P2]. Ponadto, konsekwencją większej odległości pomiędzy grupami aminowymi N1 i N3 są niższe wartości  $pK_{a1}$  oraz  $pK_{a2}$ , które odbiegają nieznacznie od danych literaturowych [153,154]. Warto jednak dodać, że opisane w artykułach przykłady pochodnych sulfonamidowych nie posiadają tak rozbudowanego podstawnika jak związek NbutylS.

W dalszej części badań wykonano obliczenia teoretyczne skupiające się na równowadze kwasowo-zasadowej pięciu pochodnych sulfonamidowych różniących się długością łańcucha alkiloaminowego. Przeprowadzone wcześniej badania eksperymentalne dotyczące związków NethylS, NpropylS oraz NbutylS pozwoliły na określenie kolejności równowag dysocjacji tych związków (**Rysunek 9**) [P2]. Zgodnie z nią deprotonacja grup funkcyjnych powinna zachodzić następująco:  $\text{-NH}_2$  pierścienia aromatycznego, grupa sulfonamidowa  $\text{-SO}_2\text{NH-}$ , a na końcu  $\text{-NH}_2$  podstawnika alifatycznego. Przeprowadzone obliczenia teoretyczne dostarczają nowych informacji dotyczących wspomnianych równowag. Biorąc pod uwagę wspomnianą wcześniej kolejność reakcji dysocjacji, dzięki przeprowadzonym obliczeniom DFT, wartości  $\text{p}K_{\text{a}3}$  były mniejsze niż odpowiadające im wartości  $\text{p}K_{\text{a}2}$ . Bliższa analiza zachodzącego mechanizmu (**Rysunek 5 w [P4]**) wykazała, że jon obojnaczy powstający po drugim procesie deprotonowania (deprotonowaniu grupy sulfonamidowej) może ulegać przegrupowaniu geometrycznemu. Mianowicie może nastąpić utworzenie wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego pomiędzy aminą alifatyczną, a deprotonowaną grupą sulfonamidową i w ten sposób dochodzi do zamknięcia ruchliwego łańcucha alkiloaminowego. W tym celu obliczono względne energie swobodne Gibbsa elektrycznie obojętnych form badanych sulfonamidów. Dzięki temu stwierdzono, że utworzenie wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego, a tym samym „zamknięcie” sulfonamidu, jest faworyzowane termodynamicznie niezależnie od rozważanego układu. W kolejnym etapie kwasowy proton można przenieść z grupy alkiloaminowej do grupy sulfonamidowej. Oczekuje się, że proces ten będzie termodynamicznie bezbarierowy dla każdego z badanych sulfonamidów z wyjątkiem NethylS. Rozważane układy, w których atom azotu grupy sulfonamidowej pełni rolę donora wiązań wodorowych, natomiast atom azotu grupy alkiloaminowej jest akceptorem. Charakteryzują się one niższymi wartościami energii swobodnej Gibbsa niż jakakolwiek inna dotychczas omawiana struktura. Należy jednak pamiętać, że sytuacja może być inna w rzeczywistym roztworze ze względu na efekty rozpuszczalnika. W oparciu o powyższe rozważania, zaproponowano następującą kolejność deprotonowania grup funkcyjnych:  $\text{-NH}_2$  pierścienia aromatycznego, grupa sulfonamidowa  $\text{-SO}_2\text{NH-}$ , kwasowe przeniesienie H z  $\text{-NH}_2$  podstawnika alifatycznego do grupy sulfonamidowej  $\text{-SO}_2\text{NH-}$ , a następnie drugie deprotonowanie grupy sulfonamidowej  $\text{-SO}_2\text{NH-}$ . Wyznaczone wartości  $\text{p}K_{\text{a}}$  dla analizowanych pochodnych sulfonamidowych zebrano w **Tabeli 8**.

**Tabela 8.** Obliczone wartości  $pK_a$  dla badanych pochodnych sulfonamidowych<sup>a</sup> (tabela nr 2 z publikacji [P4], przetłumaczona na język polski, praca Open Access – zgoda na wykorzystanie nie jest wymagana).

Nazwa związku	$pK_{a1}$ (calc.)	$pK_{a1}$ (lift.)	$pK_{a1}$ (exp.)	$pK_{a2}$ (calc.)	$pK_{a2}$ (lift.)	$pK_{a2}$ (exp.)	$pK_{a3}$ (calc.)	$pK_{a3}$ (lift.)	$pK_{a3}$ (exp.)
NethylS	-4,77	2,58	2,62 ± 0,19 <sup>b</sup>	8,15	6,14	6,45 ± 0,21 <sup>b</sup>	18,29	12,07	9,67 ± 0,08 <sup>b</sup>
NpropylS	-4,35	2,27	2,11 ± 0,10 <sup>b</sup>	8,78	6,68	6,35 ± 0,06 <sup>b</sup>	14,92	9,41	10,86 ± 0,19 <sup>b</sup>
NbutylS	-4,42	1,70	1,76 ± 0,07 <sup>c</sup>	8,32	4,49	4,51 ± 0,14 <sup>c</sup>	17,16	11,33	12,28 ± 0,04 <sup>b</sup>
NpentylS	-4,39	1,75	1,76 <sup>d</sup>	8,36	6,88	6,79 <sup>d</sup>	17,20	10,45	<sup>e</sup>
NhexylS	-5,90	1,14	1,19 <sup>d</sup>	11,72	8,24	8,04 <sup>d</sup>	16,91	10,33	<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Wartości oznaczone zapisem „calc.” pochodzą z obliczeń w oparciu o cykl termodynamiczny, natomiast wartości oznaczone „lift.” uzyskano z wykorzystaniem podejścia Muckermana. Wyniki eksperymentów oznaczono „exp.” oraz podano ich odchylenia standardowe.

<sup>b</sup> Wartości eksperymentalne uzyskane z publikacji [P2].

<sup>c</sup> Wartości eksperymentalne opisane w tym artykule [P4].

<sup>d</sup> Wartości ekstrapolowane.

<sup>e</sup> Brak danych.

Wartości  $pK_a$  obliczone z cyklu termodynamicznego różnią się istotnie od wartości wyznaczonych eksperymentalnie. Rozbieżności prawdopodobnie wynikają z niewystarczającego uwzględnienia wpływu rozpuszczalnika w obliczeniach SCRF, który jest prostym modelem układu. Zastosowanie procedury zaproponowanej przez Muckermana pozwala na uzyskanie wyników bliższych eksperymentalnym wartościom  $pK_a$ .

Przedstawione w *Tabeli 8* wartości  $pK_{a1}$  sugerują, że wydłużenie łańcucha alkiloaminowego prowadzi do wzrostu kwasowości grupy  $-NH_2$  pierścienia aromatycznego. Dla drugiego etapu deprotonowania, czyli  $pK_{a2}$ , wyniki obliczeń teoretycznych wydają się wykazywać inną tendencję niż wyniki eksperymentalne. Mianowicie, zgodnie z obliczeniami, wartości  $pK_{a2}$  powinny rosnać wraz z długością łańcucha alkiloaminowego. Natomiast wyniki eksperymentów (dla których dostępne dane ograniczają się do trzech związków) wykazują tendencję odwrotną. Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, że w przypadku pojedynczo deprotonowanego (poprzez aromatyczną grupę aminową) NbutylS istnieje stabilizujące wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe pomiędzy grupą  $-NH_3^+$  alkiloaminową a atomem tlenu ugrupowania sulfonamidowego. Przesunięcie gęstości elektronowej

z grupy sulfonamidowej na atom wodoru grupy alkiloaminowej prowadzi do wzrostu kwasowości pierwszej, powodując, że  $pK_{a2}$  NbutylS jest prawie o dwie jednostki niższe niż dla pozostałych sulfonamidów. Dodatkowo produkt wspomnianej deprotonacji jest również stabilizowany przez najsilniejsze z badanych tutaj wiązań wodorowych. W przypadku ostatniego etapu deprotonowania, tj.  $pK_{a3}$ , obliczenia i eksperyment ponownie wykazały odwrotną tendencję. Mianowicie, z obliczeń wynika, że należy spodziewać się spadku wartości  $pK_{a3}$  wraz ze wzrostem liczby grup metylenowych w łańcuchu alkilowym, natomiast eksperyment wykazał wzrost z 9,67 do 12,28 przy przejściu od NethylS do NbutylS. Jak wspomniano wcześniej, rozbieżności pomiędzy wynikami teoretycznymi i eksperymentalnymi wynikają z niedostatecznego uwzględnienia efektu rozpuszczalnika w teoretycznym opisie. Drugim istotnym czynnikiem utrudniającym uzyskanie dokładnych wartości  $pK_a$  metodami teoretycznymi jest pominięcie obecności i tym samym wpływu różnych form związków w roztworze rzeczywistym.

W omawianej publikacji skupiono się również na analizie teoretycznej wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. W rezultacie stwierdzono, że najsilniejsze wiązanie wodorowe tworzy NbutylS, natomiast najslabsze oddziaływanie obliczono dla NethylS. Dla sulfonamidu z podstawnikiem aminoetylowym obserwuje się najkrótsze wiązanie D–H (1,022 Å), najdłuższe H···A (2,392 Å) i najmniejszą wartość kąta dwuściennego  $\angle(DHA)$  (106,4 deg). Ze względu na wspomniane ograniczenia geometryczne utworzone wiązanie wodorowe jest na tyle słabe, że nie można go wykryć za pomocą topologii analizy gęstości elektronowej, ponieważ z oddziaływaniem nie są związane żadne punkty krytyczne wiązania. Analogiczna sytuacja ma miejsce w przypadku analizy FBO.

Ostatnim etapem obliczeń teoretycznych było określenie hydrofobowości analizowanych pochodnych sulfonamidowych. Stwierdzono, że parametr ten wzrasta wraz z liczbą atomów węgla w łańcuchu alkiloaminowym. Ponadto rozluźnienie tego łańcucha (poprzedzone zerwaniem wiązania wodorowego) prowadzi do zmniejszenia hydrofobowości, natomiast tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych powoduje jej wzrost.

Podsumowując, opisane w artykule badania stanowią solidną podstawę i dostarczają wielu informacji, które można wykorzystać przy projektowaniu nowych leków. Wyjaśniają zachowanie cząsteczek w środowisku wodnym, co pozwala



na wyciągnięcie wniosków na temat ich zachowania w komórce. Obecność wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych w strukturze pochodnych sulfonamidów może powodować różnice w mechanizmie oddziaływania związku z biocząsteczkami w porównaniu z cząsteczkami, w których to wiązanie nie występuje. Wyznaczone wartości  $pK_a$  związków pozwalają określić, w jakiej formie protolitycznej sulfonamid będzie występował w komórce, przy fizjologicznym pH. Obliczone siły wiązań w obrębie analizowanych cząsteczek mogą również wpływać na mechanizm oddziaływania związku z biocząsteczkami. Ponadto mogą mieć odniesienie na właściwości kompleksujące omawianych sulfonamidów z biologicznie istotnymi jonami metali, których połączenia znajdują zastosowanie także w farmaceutykach. Specyficzna hydrofobowość związków sugeruje, czy są one w stanie przenikać przez błony biologiczne, a także czy będą wydalane przez nerki. Jest to bardzo ważny aspekt brany pod uwagę przy projektowaniu nowych leków, ponieważ podróż cząsteczki leku z miejsca podania do miejsca działania jest złożona i wiąże się z wieloma zmianami w środowisku.

#### **4.5. [P5] Exploring the interaction of biologically active compounds with DNA using the SwitchSense technique, UV-Vis spectroscopy, and computational methods**

W artykule [P5] przedstawiono badania oddziaływań czterech związków niskocząsteczkowych z helisą DNA. Celem pracy była ocena bioaktywności wybranych związków z biomolekułą. W związku z tym poruszono następujące kwestie:

- charakterystyka powinowactwa badanych cząsteczek do wybranej sekwencji dwuniciowego DNA;
- określenie parametrów, takich jak współczynniki szybkości i stałe asocjacji oraz dysocjacji dla adduktu cząsteczka-DNA;
- omówienie możliwego trybu i miejsc wiązania badanych cząsteczek z konkretną sekwencją par zasad wykorzystaną w tym badaniu;
- porównanie wyników uzyskanych przy użyciu techniki switchSENSE z wynikami uzyskanymi w wyniku innych eksperymentów, w tym także metod teoretycznych.

Do badań wybrano przedstawicieli trzech ważnych grup związków biologicznie czynnych: pirazyny, sulfonamidy oraz antrachinony. Pochodne pirazyny znane są z szerokiego zastosowania w medycynie i biotechnologii ze względu na ich właściwości przeciwwgrzybicze, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe [173–176]. Antrachinony to grupa związków opartych na szkielecie antracenu-9,10-dionu, stosowania jako pigmenty w przemyśle tekstylnym [177] i spożywczym [178]. Przede wszystkim wykazują jednak szeroką aktywność biologiczną, dlatego od lat wykorzystywane są w farmakoterapii. Pochodne antrachinonu znane są głównie ze swoich właściwości przeciwnowotworowych [179]. Do badań wybrano trzy następujące związki niskocząsteczkowe: pirazyno-2-tiokarboksyamid (PTCA); NbutylS (jego syntezę i właściwości kwasowo-zasadowe opisano w [P4]) oraz pochodną antrachinonu – 1-(2-hydroksyetyloamino)-antraceno-9,10-dion (AQ-NetOH).

Do badania oddziaływania z rowkiem helisy DNA jako układ modelowy wybrano netropsynę (NET), która jest jednym z pionierskich związków wykazujących selektywne wiązanie w obrębie mniejszego rowka helisy [180,181]. Jako antybiotyk peptydowy skutecznie zwalcza zarówno bakterie *G(+)*, jak i *G(-)*, utrudniając syntezę kwasów

nukleinowych. NET wykazuje wyraźne powinowactwo do wiązania z regionami helisy bogatymi w pary zasad adenina–tymina.

Uzyskane z analizy switchSENSE wyniki oddziaływania NET z helisą DNA (*Rysunek 1 w [P5]*) wskazują na tworzenie się adduktu w procesie asocjacji. Na wykresie widoczny jest płaski odcinek trwający około 20 s, podczas którego rejestrowany jest przepływ buforu i przygotowywana jest analiza. Następnie obserwuje się ostrą krzywą wskazującą na proces asocjacji, który zachodzi zaledwie w kilka sekund. Zmiany w intensywności fluorescencji są duże, jednak zależą od temperatury, w której wykonywany jest pomiar. Wydłużenie czasu przepływu analitu przez powierzchnię chipu nie powoduje dalszych zmian, o czym świadczy odcinek pomiędzy 25, a 50 s. Zjawisko to wskazuje na utworzenie połączeń wszystkich helis DNA z badanym związkem. W następnym etapie dochodzi do zainicjowania przepływu buforu (bez analitu), rozpoczynając proces dysocjacji. Widoczna na wykresie ostra krzywa przy 50 s świadczy o szybkim rozpadzie adduktu NET–DNA. W tym momencie obserwuje się gwałtowną zmianę intensywności fluorescencji, która wraca do wartości początkowych, przed rozpoczęciem eksperymentu. Świadczy to o całkowitej dysocjacji cząsteczek NET od helisy DNA w wyniku przemywania buforem. Uzyskane wartości stałych oraz szybkości zachodzących procesów przedstawiono w *Tabeli 9*.

**Tabela 9.** Wartości (wraz z ich odchyleniami standardowymi) ustalonych szybkości asocjacji ( $k_a$ ), szybkości dysocjacji ( $k_d$ ), stałych asocjacji ( $K_A$ ) i stałych dysocjacji ( $K_D$ ) dla wiązania netropsyny z helisą DNA w buforze TE40 (tabela nr 1 z publikacji [P5], przetłumaczona na język polski, praca Open Access – zgoda na wykorzystanie nie jest wymagana).

Temp. [°C]	$k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [M]	$K_A$ [ $M^{-1}$ ]
25	$(1,74 \pm 1,10) \cdot 10^3$	$1,29 \pm 0,30$	$(913 \pm 742) \cdot 10^{-6}$	$(1,66 \pm 1,35) \cdot 10^3$
30	$(1,49 \pm 1,14) \cdot 10^3$	$1,43 \pm 0,11$	$(958 \pm 735) \cdot 10^{-6}$	$(1,04 \pm 0,80) \cdot 10^3$
37	$(2,21 \pm 1,00) \cdot 10^3$	$1,23 \pm 0,07$	$(557 \pm 254) \cdot 10^{-6}$	$(1,80 \pm 0,82) \cdot 10^3$

Zebrane wyniki nie wykazują znaczących zmian w wartościach w zależności od temperatury. Przebieg zmian fluorescencji oraz charakter krzywych pomiarowych procesów asocjacji i dysocjacji NET względem DNA były bardzo podobne

do obserwowanych we wcześniejszych badaniach dla modelowego związku interkalującego – bromku etydyny [P3]. Niestety nie zaobserwowano bezpośredniej korelacji pomiędzy przebiegiem procesów asocjacji i dysocjacji zarejestrowanych techniką switchSENSE, a trybem wiązania.

Kolejnym analizowanym związkiem był PTCA, który wykazuje aktywność biologiczną przeciwko *Candida albicans* [182]. Oddziaływanie omawianej molekuly z CT-DNA było już analizowane w naszej grupie wcześniej przy użyciu metod spektrofotometrycznych i woltamperometrycznych [56]. Uzyskane wyniki sugerowały oddziaływanie w rowku, ale nie pozwalały na jednoznaczne określenie sposobu i miejsc wiązania z helisą DNA.

Wykonano obliczenia dokowania molekularnego o niskiej rozdzielczości (**Rysunek 2 w [P5]**), co wskazało na występowanie oddziaływania PTCA z trzecim mniejszym rowkiem helisy DNA, bogatym w pary adenina–tymina. Było to najpopularniejsze miejsce wiązania, czyli miejsce charakteryzujące się największą liczbą dokowań. Najsilniejsze oddziaływanie obserwuje się w pierwszym mniejszym rowku. Zakotwiczony na powierzchni chipu fragment helisy zaczyna się od sekwencji TAG TGC, co sugeruje brak powinowactwa PTCA do poszczególnych zasad nukleinowych. Bardziej szczegółowe badania pozwalają na określenie sposobu ułożenia cząsteczki podczas oddziaływania z biomolekułą DNA (**Rysunek 3 w [P5]**). W najsilniej związanej konformacji dwa atomy wodoru grupy sulfonamidowej są słabo związane z atomem azotu guaniny. W przypadku najpopularniejszego wiązania PTCA do DNA występuje oddziaływanie niekowalencyjne, a mianowicie wiązanie wodorowe pomiędzy atomem wodoru grupy sulfonamidowej i atomem azotu adeniny.

Badania wykonane przy użyciu techniki switchSENSE związku PTCA (**Rysunek 3 w [P5]**) wskazują na inny przebieg procesów asocjacji i dysocjacji niż było to obserwowane w przypadku opisanej powyżej NET lub EB [P3]. Na wykresie widoczna jest zaokrąglona krzywa asocjacji, która rozwija się przez ok 50 s, a następnie utrzymuje stałą wartość zmian fluorescencji. Zjawisko to świadczy o powolnym procesie tworzenia się adduktu PTCA–DNA. Od 150 sekundy wartość zmiany fluorescencji spada, ale pomimo długiego czasu przemywania powierzchni chipu buforem, nie wraca ona do początkowej pozycji. W związku z tym obserwujemy niecałkowitą dysocjację, co wskazuje na to, że chociaż proces wiązania może być powolny, to pozostaje

on stosunkowo stabilny w warunkach przepływu buforu. Uzyskane wyniki przedstawiono w **Tabeli 10**.

**Tabela 10.** Wartości (wraz z ich odchyleniami standardowymi) ustalonych szybkości asocjacji ( $k_a$ ), szybkości dysocjacji ( $k_d$ ), stałych asocjacji ( $K_A$ ) i stałych dysocjacji ( $K_D$ ) dla wiązania PTCA z helisą DNA w buforze TE40 (tabela nr 2 z publikacji [P5], przetłumaczona na język polski, praca Open Access – zgoda na wykorzystanie nie jest wymagana).

Temp. [°C]	$k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [M]	$K_A$ [ $M^{-1}$ ]
25	$53,4 \pm 2,4$	$(1,23 \pm 0,08) \cdot 10^{-2}$	$(2,30 \pm 0,18) \cdot 10^{-4}$	$(4,36 \pm 0,33) \cdot 10^3$
30	$61,5 \pm 3,0$	$(1,95 \pm 0,09) \cdot 10^{-2}$	$(3,17 \pm 0,21) \cdot 10^{-4}$	$(3,16 \pm 0,21) \cdot 10^3$
37	$53,0 \pm 3,8$	$(2,32 \pm 0,13) \cdot 10^{-2}$	$(4,37 \pm 0,41) \cdot 10^{-4}$	$(2,29 \pm 0,21) \cdot 10^3$

Proces asocjacji PTCA z helisą DNA był około 20 000 razy wolniejszy niż w przypadku EB [P3] i około 30 razy – w przypadku NET. Temperatura układu w badanym zakresie nie ma znaczącego wpływu na szybkość asocjacji ( $k_a$ ), jednak widać tendencję w przypadku szybkości procesu dysocjacji ( $k_d$ ). Wartości te wpływają również na stałą zachodzących procesów ( $K_A$  i  $K_D$ ). Wraz ze wzrostem temperatury zaobserwowano spadek stałej asocjacji. Wartość ta wyznaczona na podstawie pomiaru techniką switchSense ( $4,36 \cdot 10^3 M^{-1}$  w  $25^\circ C$ ) jest niższa od wartości uzyskanych metodami woltamperometrycznymi ( $1,16 \cdot 10^4 M^{-1}$  i  $1,04 \cdot 10^4 M^{-1}$  przy CV i DPV odpowiednio) i metodą spektrofotometryczną ( $5,14 \cdot 10^4 M^{-1}$ ) [182]. Należy jednak pamiętać, że nie tylko warunki prowadzenia tych eksperymentów różnią się od siebie (np. rodzaj użytego DNA), ale także każda z tych technik wykorzystuje inne właściwości fizykochemiczne badanych związków. Dodatkowo switchSENSE analizuje w czasie rzeczywistym proces wiązania zachodzący w przepływie buforu, natomiast podejście spektrofotometryczne i woltamperometryczne wykorzystuje analizę równowag występujących w roztworze.

Następnym badanym związkiem była pochodna 4-amino-N-(2-aminobutylo)benzenosulfonamid (NbutylS). Ze względu na jego właściwości spektroskopowe i elektrochemiczne, jak i badanej wcześniej grupy jego homologów [P3], określenie stałej wiązania z DNA za pomocą technik spektrofotometrycznych

i voltamperometrycznych okazało się bardzo problematyczne. Nakładanie się pasm absorpcji analitu i kwasu nukleinowego oraz małe natężenie sygnału prądowego spowodowało konieczność zastosowania innych metod – obliczeń teoretycznych i techniki switchSENSE. Początkowo wykonano obliczenia dokowania molekularnego (*Rysunek 2 i 4 w [P5]*). Ze względu na możliwość utworzenia wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego obejmującego łańcuch alkiloaminowy związku NbutylS, w obliczeniach uwzględniono zarówno strukturę cząsteczki z łańcuchem niezwiązanym (no-HB), jak i z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym (HB). W obu przypadkach dowiedziono, że najpopularniejsze wiązanie obserwuje się w trzecim mniejszym rowku, bogatym w adeninę oraz tyminę. W przypadku NbutylS (no-HB) najsilniejsze oddziaływanie stwierdzono natomiast w czwartym mniejszym rowku. W tym przypadku występują cztery wiązania wodorowe utworzone pomiędzy analitem, a receptorem. Jedno z nich odbywa się przez aromatyczną grupę aminową sulfonamidu i atomem tlenu grupy karbonylowej tyminy z helisy DNA. Kolejne połączenie zachodzi pomiędzy atomem wodoru grupy sulfonamidowej i atomem tlenu grupy karbonylowej cytozyny. Ostatnie dwa wiązania wodorowe odbywają się poprzez oddziaływanie atomów wodoru grupy alkiloaminowej z atomami tlenu grupy fosforanowej dezoksyrybozy i grupy karbonylowej tyminy. W przypadku najpopularniejszego oddziaływania związku NbutylS (no-HB) obserwuje się utworzenie dwóch wiązań. Są to mianowicie połączenia aromatycznej grupy aminowej z grupą karbonylową tyminy oraz grupy alkiloaminowej z deoksyrybozą. Podczas tworzenia najsilniejszego wiązania NbutylS (HB) z helisą DNA obserwuje się trzy wiązania wodorowe pomiędzy ligandem, a receptorem występujące w drugim mniejszym rowku. Pierwsze z nich odbywa się poprzez oddziaływanie grupy alkiloaminowej atomem N grupy purynowej adeniny. Kolejne wiązanie zostaje utworzone pomiędzy atomem H grupy alkiloaminowej i grupy sulfonamidowej liganda, dzięki czemu dochodzi do zamknięcia struktury i zablokowania wolnego łańcucha. Ostatnie z obserwowanych w tym przypadku międzycząsteczkowych wiązań wodorowych powstaje pomiędzy aromatyczną grupą aminową analitu i atomem O dezoksyrybozy. W przypadku występowania najbardziej popularnego oddziaływania stwierdzono natomiast obecność pojedynczego wiązania łączącego aminę aromatyczną liganda z grupą karbonylową tyminy. Z symulacji dokowania molekularnego wynika, że związek NbutylS jak i jego homologi [P3] wykazują wysokie powinowactwo do tych samych części badanej helisy DNA, najprawdopodobniej ze względu na podobną budowę strukturalną.

W kolejnym etapie przeprowadzono analizę oddziaływań NbutylS z biomolekułą DNA. Na wykresach zmian fluorescencji zarejestrowanych techniką switchSENSE (*Rysunek 4 w [P5]*) zaobserwowano bardzo podobny przebieg procesów asocjacji i dysocjacji adduktu jak dla PTCA i homologów sulfonamidów: NethylS i NpropylS [**P3**]. Proces asocjacji przebiegał mianowicie bardzo wolno, a przepływ analitu trwał najdłużej ze wszystkich badanych w tej pracy związków. Krzywe reprezentujące powstające wiązanie mają bardzo niewielkie nachylenie. Ponadto wykres przedstawia powolny i niepełny proces dysocjacji utworzonego adduktu po zakończeniu przepływu analitu. Oznacza to, że oddziaływanie związku z DNA zachodzi powoli, ale powstały addukt jest na tyle stabilny, że nawet wydłużenie etapu dysocjacji nie prowadzi do całkowitego zakończenia tego procesu. Uzyskane wyniki przedstawiono w *Tabeli 11*.

*Tabela 11. Wartości (wraz z ich odchyleniami standardowymi) ustalonych szybkości asocjacji ( $k_a$ ), szybkości dysocjacji ( $k_d$ ), stałych asocjacji ( $K_A$ ) i stałych dysocjacji ( $K_D$ ) dla wiązania NbutylS z helisą DNA w buforze PE40 (tabela nr 3 z publikacji [**P5**], przetłumaczona na język polski, praca Open Access – zgoda na wykorzystanie nie jest wymagana).*

Temp. [°C]	$k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [M]	$K_A$ [ $M^{-1}$ ]
25	$10,6 \pm 0,3$	$(1,35 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$	$(1,27 \pm 0,04) \cdot 10^{-4}$	$(7,87 \pm 0,23) \cdot 10^3$
30	$11,4 \pm 0,2$	$(8,19 \pm 0,07) \cdot 10^{-4}$	$(7,16 \pm 0,13) \cdot 10^{-5}$	$(1,40 \pm 0,03) \cdot 10^4$
37	$15,5 \pm 0,1$	$(1,02 \pm 0,01) \cdot 10^{-3}$	$(6,60 \pm 0,12) \cdot 10^{-4}$	$(1,51 \pm 0,03) \cdot 10^4$

Wyznaczone parametry szybkości tworzenia i dysocjacji adduktu ( $k_a$  i  $k_d$ ) wykorzystano do obliczenia wartości stałych asocjacji ( $K_A$ ). Wartości przedstawione w *Tabeli 11* są wyższe niż dla homologów NethylS i NpropylS badanych wcześniej (*Tabela 6*) [**P3**]. Ponadto zaobserwowano wyraźny wzrost zarówno wartości szybkości asocjacji ( $k_a$ ), jak i wartości stałej wiązania ( $K_A$ ) wraz ze wzrostem temperatury.

Ostatnim obiektem badawczym była pochodna antrachinonu – 1-(2-hydroksyetyloamino)-antraceno-9,10-dion (AQ-NetOH). W jej przypadku przeprowadzono dokowanie molekularne oraz analizę oddziaływań związku z helisą DNA z wykorzystaniem techniki switchSENSE i miareczkowania spektrofotometrycznego.

Badania kinetyki switchSENSE oddziaływania AQ-NetOH z DNA (*Rysunek 5 w [P5]*) wykazały zupełnie inny przebieg zarejestrowanych zmian w porównaniu z pochodnymi pirazyny i sulfonamidu. Proces asocjacji zachodzi bardzo szybko o czym świadczy ostra krzywa zmiany fluorescencji o około 10%. W dalszej części wykresu widoczna jest linia prosta, która świadczy o całkowitym związaniu analitu z helisą DNA. Proces dysocjacji również zachodzi szybko. Obserwuje się nagłą zmianę wartości fluorescencji do poziomu początkowego przed wykonaniem eksperymentu. Świadczy to również o całkowitej dysocjacji powstającego adduktu. Wyznaczone parametry kinetyczne przedstawiono w *Tabeli 12*.

**Tabela 12.** Wartości (wraz z ich odchyleniami standardowymi) ustalonych szybkości asocjacji ( $k_a$ ), szybkości dysocjacji ( $k_d$ ), stałych asocjacji ( $K_A$ ) i stałych dysocjacji ( $K_D$ ) dla wiązania AQ-NetOH z helisą DNA w buforze TE40 (tabela nr 4 z publikacji [P5], przetłumaczona na język polski, praca Open Access – zgoda na wykorzystanie nie jest wymagana).

Temp. [°C]	$k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [M]	$K_A$ [ $M^{-1}$ ]
25	$(4,78 \pm 0,61) \cdot 10^4$	$0,96 \pm 0,02$	$(2,01 \pm 0,24) \cdot 10^{-5}$	$(4,97 \pm 0,65) \cdot 10^4$
30	$(5,85 \pm 2,06) \cdot 10^4$	$1,27 \pm 0,05$	$(2,17 \pm 0,77) \cdot 10^{-5}$	$(4,60 \pm 1,63) \cdot 10^4$
37	$(3,71 \pm 1,27) \cdot 10^4$	$0,91 \pm 0,17$	$(2,43 \pm 0,95) \cdot 10^{-5}$	$(4,12 \pm 1,62) \cdot 10^4$

Wartość  $k_a$  jest około trzydzieści razy niższa niż dla EB [P3], ale aż tysiąc razy większa niż w przypadku PTCA i nawet kilka tysięcy razy większa niż dla NbutylS. Powstały addukt również bardzo szybko rozpada się pod wpływem przepływu buforu. Mianowicie, jego dysocjacja następuje w ciągu około 1 s, o czym świadczą wartości  $k_d$ . Wartość stałej  $K_A$ , obliczona na podstawie szybkości asocjacji i dysocjacji, wynosi  $4,97 \cdot 10^4 M^{-1}$  w temperaturze 25°C. Jest to najwyższa wartość spośród wszystkich wyznaczonych techniką switchSENSE dla związków przedstawionych w omawianej pracy. Jest ona jednocześnie o dwa rzędy wartości mniejsza niż w przypadku EB, który w tej temperaturze charakteryzował się wartością  $K_A$  wynoszącą ok.  $4 \cdot 10^6 M^{-1}$  [P3]. Wartości stałej asocjacji nieznacznie maleją wraz ze wzrostem temperatury, w której przeprowadzono doświadczenie.



W przypadku pochodnej antrachinonu przeprowadzono także badania spektrofotometryczne (*Rysunek 6 w [P5]*). Właściwości spektroskopowe analitu umożliwiły analizę oddziaływania AQ-NetOH z helisą DNA. Doświadczenie opierało się na monitorowaniu zmian absorbancji analitu wraz ze wzrostem stężenia DNA. Związek AQ-NetOH w buforze Tris/HCl w zakresie długości fal 350–200 nm ma trzy maksima absorpcji: 316 nm, 276 nm i 247 nm. Roztwór DNA charakteryzuje się występowaniem jednego pasma, które rozciąga się od ok 230–300 nm. Aby uniknąć efektu nakładania się pasm absorpcyjnych AQ-NetOH i DNA, wyznaczono stałą wiązania dla zmian absorbancji przy długości fali 316 nm, przy której roztwór DNA nie absorbuje. Wraz ze wzrostem stężenia DNA obserwuje się nieznaczny wzrost absorbancji, który ustaje po przekroczeniu stosunku molowego DNA:AQ-NetOH 1:1. Oznacza to, że kolejne fragmenty DNA nie wprowadzają żadnych zmian widmowych. Na podstawie przedstawionych obserwacji można stwierdzić, że dochodzi do utworzenia adduktu z AQ-NetOH. Stała wiązania, określona na podstawie wykresu miareczkowania spektrofotometrycznego wynosi  $9,97 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ .

Obliczenia teoretyczne (*Rysunek 2 i 5 w [P5]*) wskazują na występowanie najpopularniejszego wiązania w trzecim, mniejszym rowku, bogatymi w adeninę oraz tyminę. Najsilniejsze oddziaływanie natomiast obserwuje się w pierwszym, mniejszym rowku. Ten fragment helisy zaczyna się od sekwencji TAG TGC, co sugeruje brak występowania powinowactwa AQ-NetOH do określonych zasad nukleinowych. Wyniki dokowania molekularnego o wysokiej rozdzielczości wskazują na obecność wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego pomiędzy atomem H grupy hydroksylowej związku, a atomem O deoksyrybozy. W związku z tym, grupa  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$  przyłączona do antrachinonu jest kluczowa dla jego wiązania z helisą DNA.

W omawianej pracy opisano zastosowanie trzech podejść do określenia oddziaływania związków niskocząsteczkowych z helisą DNA. Wykorzystanie w tym celu techniki switchSENSE zapewniło wgląd w kinetykę procesów asocjacji i dysocjacji. Warto jednak dodać, że metoda ta nie dostarcza informacji o miejscach i trybach wiązania. W związku z tym, badania uzupełniono o dokowanie molekularne oraz spektrofotometrię UV-Vis.

Uzyskane wyniki dowodzą, że pochodna antrachinonu (AQ-NetOH) wykazuje najwyższy współczynnik asocjacji, co wskazuje na szybkie tworzenie się adduktu.

Ponadto, zmiany temperatury wpływają w różny sposób na kinetykę wiązania poszczególnych analitów. Podczas gdy PTCA wykazuje przyspieszoną dysocjację w wyższych temperaturach, NbutylS charakteryzuje się niecałkowitą dysocjacją, podkreślając złożony charakter tych oddziaływań.

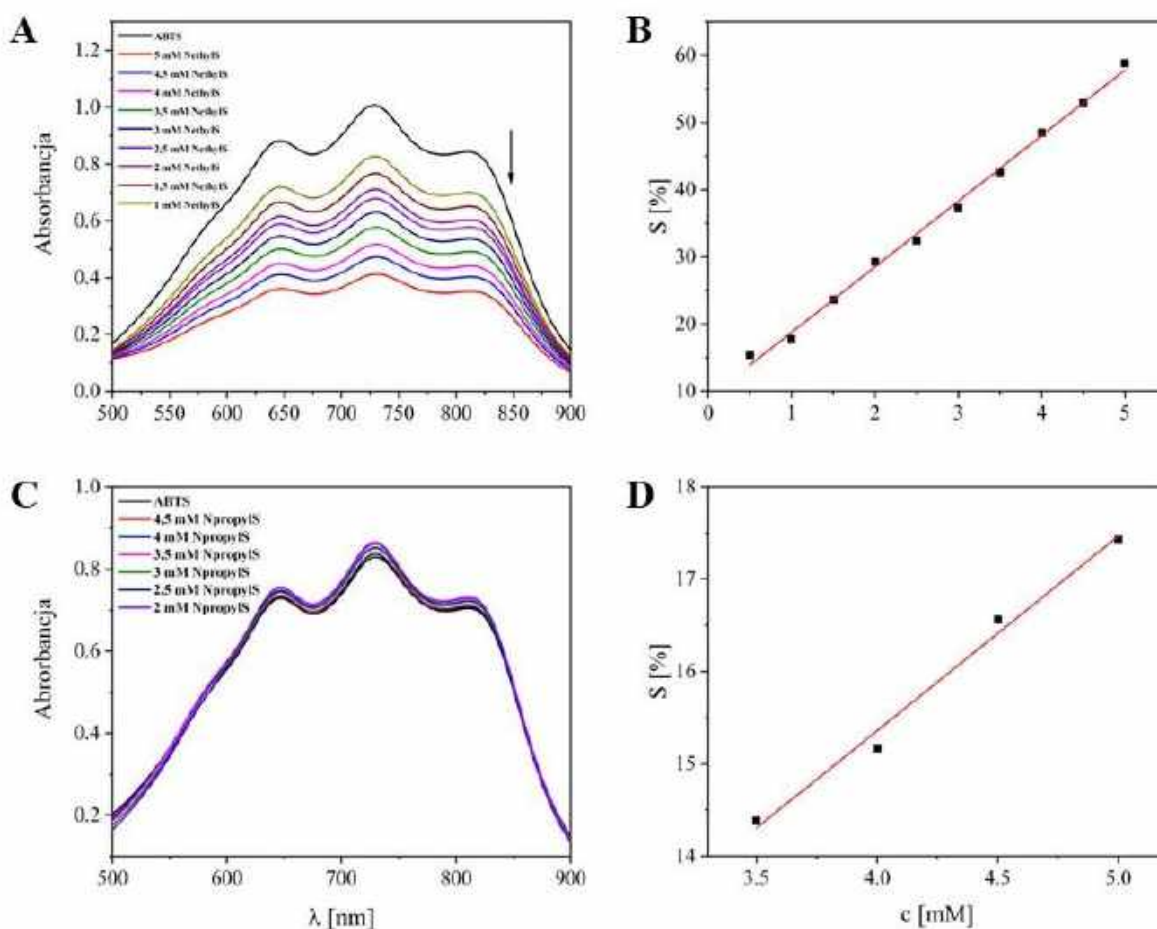
Reasumując, technika switchSENSE stanowi obiecujące narzędzie do szybkiej oceny bioaktywności związków w laboratoriach chemicznych. Choć wartości stałych wiązania mogą nieznacznie różnić się od innych technik, analiza w czasie rzeczywistym zapewnia unikalny wgląd w kinetykę asocjacji i dysocjacji.

## 4.6. Wyniki nieopublikowane wchodzące w skład rozprawy

### 4.6.1. Badanie właściwości przeciwutleniających

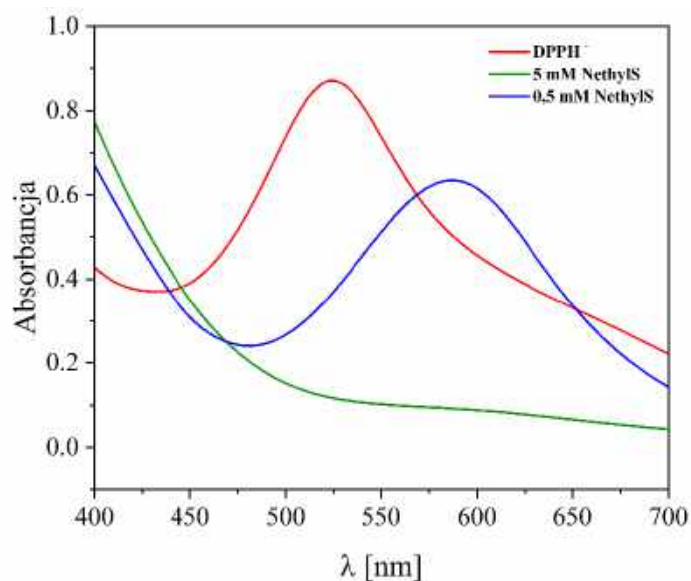
Zbadano właściwości przeciwutleniające pochodnych sulfonamidowych NethylS oraz NpropylS względem rodników organicznych ( $ABTS^+$  i DPPH). Dzięki temu możliwe jest określenie zdolności omawianych związków do wychwytywania reaktywnych form tlenku (ROS).

Otrzymane wyniki (*Rysunek 10*) wskazują na wysoką aktywność związku NethylS polegającą na usuwaniu rodników  $ABTS^+$ . Związek o dłuższym łańcuchu alkiloaminowym nie wygasza analizowanego rodnika – brak widocznych zmian w absorbancji. Z *Rysunku 10A* odczytano stężenie związku NethylS, które powoduje zmniejszenie o 50 % badanego rodnika. Wartość ta wynosi 4,21 mM.



**Rysunek 10.** Wykres zależności absorbancji od długości fali dla roztworu rodnika  $ABTS^+$  oraz serii rozcieńczeń związku **A.** NethylS, **C.** NpropylS; Wykres aktywności polegający na usuwaniu rodników  $ABTS^+$  związku **B.** NethylS i **D.** NpropylS.

Badania właściwości przeciwutleniających wobec rodnika DPPH<sup>•</sup> nie pozwalają na określenie zdolności analizowanych związków do wygaszania rodnika organicznego. Zgodnie z literaturą podczas wygaszania rodnika DPPH<sup>•</sup> obserwuje się zmianę barwy roztworu z fioletowej na żółtą [183]. W przypadku analizowanych związków, obserwowano zmianę barwy roztworów z fioletowej na niebieską, co sugeruje występowanie reakcji konkurencyjnej. Na **Rysunku 11** można zaobserwować przesunięcie pasma absorpcji w kierunku wyższych wartości długości fali. Nie obserwuje się widm sugerujących proces wygaszania rodnika organicznego.

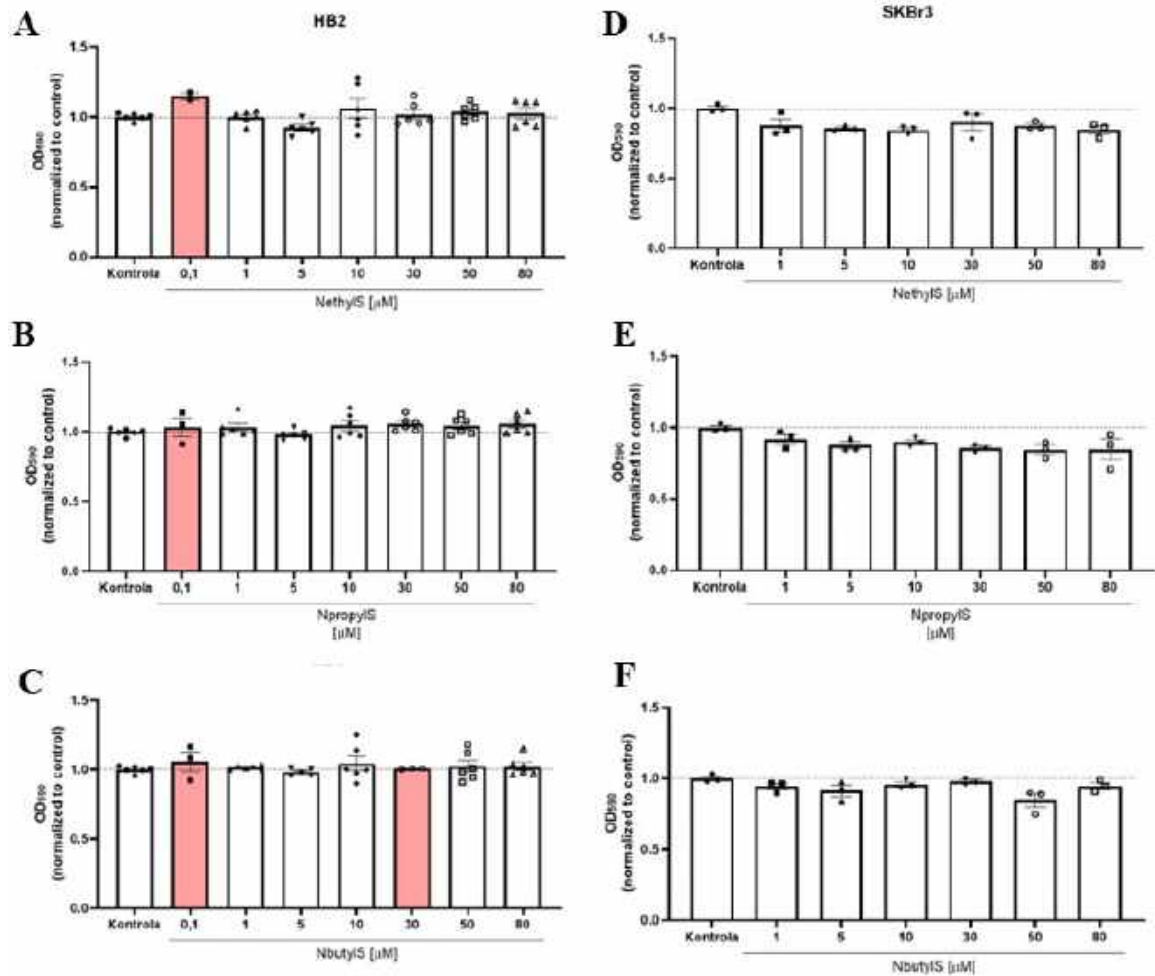


**Rysunek 11.** Wykres zależności absorbancji od długości fali dla roztworu DPPH<sup>•</sup> oraz wraz z dodatkiem związku NethylS.

Wykonane badania właściwości przeciwutleniających pochodnych sulfonamidowych NethylS i NpropylS wskazują na ich zdolność do wygaszania rodnika ABTS<sup>•+</sup>. Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że wzrost długości łańcucha alkiloaminowego analizowanych związków wpływa na zmniejszenie właściwości przeciwutleniających badanych sulfonamidów.

#### 4.6.2. Badanie cytotoksyczności

Określenie aktywności biologicznej pochodnych sulfonamidowych na udostępnionych mi liniach komórkowych miało na celu obranie dalszego kierunku badań. Analiza cytotoksyczności wykonana została na komórkach HB2 (nie-nowotworowe komórki nabłonka piersi) i SKBr3 (gruczolakorak piersi) dla trzech związków (NethylS, NpropylS, NbutylS). Uzyskane wyniki przedstawiono na **Rysunku 12**.



**Rysunek 12.** Wyniki badań cytotoksyczności na komórkach HB2 dla związku **A.** NethylS, **B.** NpropylS, **C.** NbutylS oraz komórek SKBr3 dla **D.** NethylS, **E.** NpropylS i **F.** NbutylS.

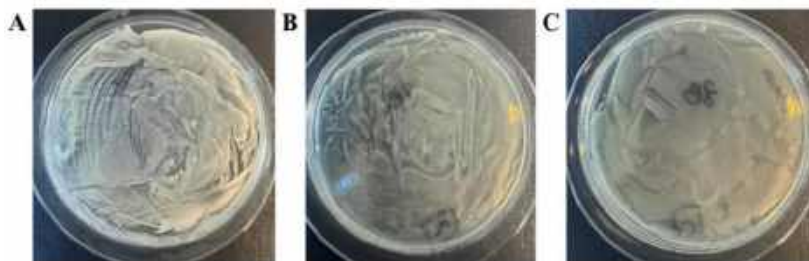
Na wykresach wartości gęstości optycznej (OD) dla analizowanych związków w przypadku obu linii komórkowych nie przekraczają wyników uzyskanych dla prób kontrolnych bez dodatku sulfonamidów. Widoczne są jedynie nieznaczne odchylenia, które nie wpływają na ocenę cytotoksyczności substancji. Przedstawione wyniki badań wskazują na brak cytotoksyczności wszystkich trzech analizowanych pochodnych sulfonamidowych względem nie-nowotworowych komórek nabłonka piersi (HB2) oraz komórek gruczołakoraka piersi (SKBr3) w zakresie stężeń 1  $\mu$ M – 80  $\mu$ M.

#### 4.6.3. Badania mikrobiologiczne

Badania mikrobiologiczne przeprowadzono w celu określenia najmniejszego stężenia hamującego wzrost mikroorganizmów (MIC) oraz najmniejszego stężenia bakteriobójczego (MBC). Analizy wykonano dla trzech pochodnych sulfonamidowych różniących się długością łańcucha alkiloaminowego na szczepach bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus* – gronkowca złocistego), Gram-ujemnych (*Escherichia coli* – pałeczki okrężnicy) oraz drożdży *Candida albicans*.

Po przeprowadzeniu badania zaobserwowano zmętnienie mieszaniny we wszystkich dołkach zawierających roztwory pochodnych sulfonamidowych. Świadczy to o wzroście drobnoustrojów chorobotwórczych, w związku z czym nie było możliwe określenie wartości MIC dla analizowanych związków. W wykonanych próbach kontrolnych określono ilość występujących kolonii: 7450 kolonii/ml dla *Staphylococcus aureus*, 3370 kolonii/ml dla *Escherichia coli* oraz 700 kolonii/ml dla *Candida albicans*.

Ponadto analizy dla pochodnych sulfonamidowych wykonane na szalkach Petriego z pożywką TSA również wskazują na ich brak aktywności przeciw wyżej wymienionym mikroorganizmom. We wszystkich próbach widoczny był wzrost namnażania się drobnoustrojów (**Rysunek 13**), co uniemożliwiło określenie wartości MBC dla badanych związków.



**Rysunek 13.** Przykładowe zdjęcia posiewów mikrobiologicznych dla **A.** *Staphylococcus aureus* – gronkowca złocistego ze związkiem *NethylS* o stężeniu  $800 \mu\text{M}$ , **B.** *Escherichia coli* – pałeczki okrężnicy z *NpropylS* o stężeniu  $800 \mu\text{M}$  oraz **C.** drożdży *Candida albicans* z *NbutylS* o stężeniu  $800 \mu\text{M}$ .

Przeprowadzone badania mikrobiologiczne nie pozwoliły na określenie najmniejszego stężenia hamującego wzrost mikroorganizmów (MIC) oraz najmniejszego stężenia bakteriobójczego (MBC). Na podstawie wykonanych analiz można stwierdzić jednoznacznie, że pochodne sulfonamidowe *NethylS*, *NpropylS* i *NbutylS* w zakresie stężeń  $800 \mu\text{M}$  –  $100 \mu\text{M}$  nie wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowych.

## 5. Podsumowanie

Narastający problem lekooporności oraz wzrost zachorowań na nowotwory zmusza do poszukiwania nowych farmaceutyków. Projektowanie leków może odbywać się poprzez modyfikację związków o udowodnionej aktywności biologicznej w celu poszerzenia spektrum ich działania. Ponadto, niektóre cząsteczki mogą również wiązać się koordynacyjnie z jonami metali.

Celem niniejszej dysertacji było wprowadzenie modyfikacji w strukturze sulfonamidów (NethylS, NpropylS i NbutylS) oraz określenie wpływu długości ich łańcucha alkiloaminowego na właściwości fizykochemiczne, powinowactwo do helisy DNA, zdolności koordynacyjne, cytotoksyczność, badania przeciwutleniające oraz mikrobiologiczne.

Badania obejmowały syntezę oraz analizę strukturalną otrzymanych pochodnych. Ponadto, wykonano doświadczenia pozwalające na zdefiniowanie profili elektrochemicznych związków, ich właściwości kwasowo-zasadowych oraz kompleksotwórczych z trójwartościowymi jonami rutenu i rodu. Następnie przeprowadzono badanie charakteru przeciwutleniającego omawianych pochodnych sulfonamidowych oraz ich zdolności do oddziaływania z fragmentem dwuniciowego łańcucha DNA. W ostatnim etapie wykonane zostały testy cytotoksyczności oraz badania mikrobiologiczne w celu określenia aktywności biologicznej omawianych pochodnych sulfonamidowych.

Przeprowadzony przegląd literaturowy w publikacji [P1] dotyczący zastosowania technik elektrochemicznych do analizy oddziaływań cząsteczek z biomolekułą DNA, pozwolił na uporządkowanie wiedzy o preferowane podejścia eksperymentalne, materiały elektrodowe oraz nowe metody ich modyfikacji. W artykule podsumowano różne podejścia elektrochemiczne, które coraz częściej znajdują swoje zastosowanie w poruszanej tematyce.

Publikacja [P2] przedstawia syntezę i badanie właściwości fizykochemicznych dwóch pochodnych sulfonamidowych – NethylS i NpropylS. Do najważniejszych wniosków opisanych w artykule zalicza się następujące tezy:

- proces utleniania zachodzi łatwiej dla związku z krótszym łańcuchem alkiloaminowym;
- wartość pH nie wpływa na przebieg zachodzących procesów redoks;

- wzrost długość podstawnika alkiloaminowego powoduje zwiększenie odległości grupy aminowej od reszty cząsteczki, a co za tym idzie wzrost zasadowości z obrębie tej grupy;
- wraz z długością łańcucha zmniejsza się wartość  $pK_{a1}$ ;
- pochodne NethylS i NpropylS tworzą związki koordynacyjne z jonami Rh(III) i Ru(III), których stechiometrię M:L określono jako 1:2 ( $ML_2$ );
- w przypadku jonów Rh(III) bardziej uprzywilejowaną formą związku kompleksowego jest sześcioczłonowy pierścień chelatowy (z ligandem NpropylS), natomiast jon Ru(III) preferuje utworzenie pięcioczłonowego pierścienia poprzez kompleksowanie z NethylS.

W kolejnym artykule [P3] skupiono się na przedstawieniu wyników badań oddziaływań pochodnym sulfonamidowych z helisą DNA. Jako modelowy układ i jednocześnie punkt odniesienia wykorzystano bromek etydyny. Najważniejsze osiągnięcia tej pracy są następujące:

- stwierdzenie występowania dużego powinowactwa bromku etydyny (EB) do adeniny oraz tyminy;
- temperatura wpływa na szybkość asocjacji ( $k_a$ ) w przypadku związku EB;
- metoda dynamiczna nie jest odpowiednia (niewystarczająco czuła) do badania oddziaływań związków niskocząsteczkowych z helisą kwasu nukleinowego;
- sulfatiazol (STZ) wykazuje powinowactwo do adeniny oraz tyminy;
- zarówno NethylS, jak i NpropylS wykazują wysokie powinowactwo do tych samych części badanej helisy DNA;
- addukty NethylS–DNA i NpropylS–DNA charakteryzują się wysoką stabilnością, co powoduje występowanie niecałkowitej dysocjacji;
- określenie wartości współczynników szybkości ( $k_a$ ,  $k_d$ ) oraz stałych ( $K_A$ ,  $K_D$ ) asocjacji i dysocjacji dla związków EB, NethylS i NpropylS z wykorzystaniem techniki switchsENSE.

Badania przeprowadzone w publikacji [P4] opierają się na analizie właściwości kwasowo-zasadowych pięciu pochodnych sulfonamidowych z wykorzystaniem metod obliczeniowych. Uzyskane wyniki zostały porównane z danymi eksperymentalnymi.



Otrzymane wnioski są następujące:

- obecność wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych w strukturze pochodnych sulfonamidowych może powodować różnice w mechanizmie oddziaływania związku z biocząsteczkami;
- w przypadku elektrycznie obojętnych form badanych sulfonamidów najsilniejsze wiązanie H występuje w NbutylS;
- tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych prowadzi do wzrostu hydrofobowości;
- hydrofobowość badanych układów wzrasta wraz z długością łańcucha alkiloaminowego.

Ostatni omawiany artykuł [P5] opisuje analizę oddziaływania związków niskocząsteczkowych z biomolekułą DNA. Określono wartości szybkości ( $k_a$ ,  $k_d$ ) oraz stałych ( $K_A$ ,  $K_D$ ) asocjacji i dysocjacji dla badanych związków. Na podstawie otrzymanych wyników można było sformułować następujące stwierdzenie:

- addukt PTCA–DNA charakteryzuje się dużą stabilnością, ze względu na niecałkowity proces dysocjacji;
- w przypadku PTCA temperatura nie wpływa znacząco na szybkość zachodzącego procesu asocjacji ( $k_a$ );
- najczęstsze wiązanie związku NbutylS z helisą DNA obserwuje się w trzecim mniejszym rowku, bogatym w adeninę oraz tyminę, co świadczy o powinowactwie cząsteczki do tych zasad nukleinowych;
- oddziaływanie związku NbutylS z DNA zachodzi powoli, ale powstały addukt jest na tyle stabilny, że nawet wydłużenie etapu dysocjacji nie prowadzi do jego całkowitej dysocjacji;
- wzrost temperatury wpływa zarówno na szybkość asocjacji ( $k_a$ ) oraz stałej ( $K_A$ ) w przypadku związku NbutylS;
- związek AQ-NetOH nie wykazuje powinowactwa do określonych zasad nukleinowych;
- w przypadku związku AQ-NetOH proces asocjacji zachodzi szybko, a dysocjacja powstałego adduktu jest całkowita;

- wartości stałej asocjacji ( $K_A$ ) nieznacznie maleją wraz ze wzrostem temperatury dla AQ-NetOH.

Wykonane badania właściwości przeciwutleniających dwóch badanych pochodnych sulfonamidowych wskazują na ich zdolność do wygaszania rodnika  $ABTS^+$ .

Zaproponowane w badaniach struktury analizowanych związków nie wykazują toksyczności względem zdrowych i nowotworowych komórek nabłonka piersi (HB2 i SKBr3). Ponadto, nie są aktywne względem bakterii G(+) – *Staphylococcus aureus* (gronkowca złocistego), G(-) – *Escherichia coli* (pałeczki okrężnicy) oraz drożdży *Candida albicans*.

## 6. Bibliografia

1. Paneri, M.; Sevta, P. Overview of Antimicrobial Resistance: An Emerging Silent Pandemic. *Glob. J. Med. Pharm. Biomed. Update* **2023**, *18*, doi:10.25259/GJMPBU\_153\_2022.
2. Maria, C.; de Matos, A.M.; Rauter, A.P. Recent Antibacterial Carbohydrate-Based Prodrugs, Drugs and Delivery Systems to Overcome Antimicrobial Resistance. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2024**, *78*, 102419, doi:10.1016/j.cbpa.2023.102419.
3. Peet, N.P. Drug Resistance: A Growing Problem. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 583–586, doi:10.1016/j.drudis.2010.04.002.
4. Aghamohammad, S.; Rohani, M. Antibiotic Resistance and the Alternatives to Conventional Antibiotics: The Role of Probiotics and Microbiota in Combating Antimicrobial Resistance. *Microbiol. Res.* **2023**, *267*, 127275, doi:10.1016/j.micres.2022.127275.
5. Breijyeh, Z.; Karaman, R. Design and Synthesis of Novel Antimicrobial Agents. *Antibiotics* **2023**, *12*, 628, doi:10.3390/antibiotics12030628.
6. Almanaa, T.N.; Alyahya, S.A.; Khaled, J.M.; Shehu, M.R.; Alharbi, N.S.; Kadaikunnan, S.; Alobaidi, A.S.; Khalid Alzahrani, A. The Extreme Drug Resistance (XDR) *Staphylococcus Aureus* Strains among Patients: A Retrospective Study. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 1985–1992, doi:10.1016/j.sjbs.2020.04.003.
7. Wilson, T.K.; Zishiri, O.T.; El Zowalaty, M.E. Molecular Detection of Multidrug and Methicillin Resistance in *Staphylococcus Aureus* Isolated from Wild Pigeons (*Columba Livia*) in South Africa. *One Health* **2024**, *18*, 100671, doi:10.1016/j.onehlt.2023.100671.
8. Al-Shaebi, Z.; Uysal Ciloglu, F.; Nasser, M.; Kahraman, M.; Aydin, O. *Staphylococcus Aureus*-Related Antibiotic Resistance Detection Using Synergy of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Deep Learning. *Biomed. Signal Process. Control* **2024**, *91*, 105933, doi:10.1016/j.bspc.2023.105933.
9. Singh, N.; Singh, P.K.; Singh, U.; Garg, R.; Jain, A. Fluroquinolone Drug Resistance among MDR-TB Patients Increases the Risk of Unfavourable Interim Microbiological Treatment Outcome: An Observational Study. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2021**, *24*, 40–44, doi:10.1016/j.jgar.2020.11.011.

10. Cohen, T.; Jenkins, H.E.; Lu, C.; McLaughlin, M.; Floyd, K.; Zignol, M. On the Spread and Control of MDR-TB Epidemics: An Examination of Trends in Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance Data. *Drug Resist. Updat.* **2014**, *17*, 105–123, doi:10.1016/j.drup.2014.10.001.
11. Cesilia, C.; Tirtosudiro, M.A.; Nataprawira, H.M. Bedaquiline (BDQ) Resistance in an Adolescent with Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB): An Alarm for Pediatricians. *IDCases* **2023**, *34*, e01880, doi:10.1016/j.idcr.2023.e01880.
12. Nolden, M.; Brockmann, A.; Ebbinghaus-Kintscher, U.; Brueggen, K.-U.; Horstmann, S.; Paine, M.J.I.; Nauen, R. Towards Understanding Transfluthrin Efficacy in a Pyrethroid-Resistant Strain of the Malaria Vector *Anopheles Funestus* with Special Reference to Cytochrome P450-Mediated Detoxification. *Curr. Res. Parasitol. Vector-Borne Dis.* **2021**, *1*, 100041, doi:10.1016/j.crpvbd.2021.100041.
13. Aratikatla, E.K.; Kalamuddin, M.; Rana, K.C.; Datta, G.; Asad, M.; Sundararaman, S.; Malhotra, P.; Mohammed, A.; Bhattacharya, A.K. Combating Multi-Drug Resistant Malaria Parasite by Inhibiting Falcipain-2 and Heme-Polymerization: Artemisinin-Peptidyl Vinyl Phosphonate Hybrid Molecules as New Antimalarials. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *220*, 113454, doi:10.1016/j.ejmech.2021.113454.
14. Dhar, R.; Zhang, K.; Talwar, G.P.; Garg, S.; Nirbhay Kumar Inhibition of the Growth and Development of Asexual and Sexual Stages of Drug-Sensitive and Resistant Strains of the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* by Neem (*Azadirachta Indica*) Fractions. *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *61*, 31–39, doi:10.1016/S0378-8741(98)00012-9.
15. Sivay, M.V.; Maksimenko, L.V.; Nalimova, T.M.; Nefedova, A.A.; Osipova, I.P.; Kriklivaya, N.P.; Gashnikova, M.P.; Ekushov, V.E.; Totmenin, A.V.; Kapustin, D.V.; et al. HIV Drug Resistance among Patients Experiencing Antiretroviral Therapy Failure in Russia, 2019–2021. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2024**, *63*, 107074, doi:10.1016/j.ijantimicag.2023.107074.
16. Park, S.Y.; Faraci, G.; Ganesh, K.; Dubé, M.P.; Lee, H.Y. Portable Nanopore Sequencing Solution for Next-Generation HIV Drug Resistance Testing. *J. Clin. Virol.* **2024**, *171*, 105639, doi:10.1016/j.jcv.2024.105639.
17. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and

- Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249, doi:10.3322/caac.21660.
18. Cancer (IARC), T.I.A. for R. on Global Cancer Observatory; online: <https://gco.iarc.fr/> (dostęp z 27 lutego 2024).
19. Cheng, H.-Y.; Su, G.-L.; Wu, Y.-X.; Chen, G.; Yu, Z.-L. Extracellular Vesicles in Anti-Tumor Drug Resistance: Mechanisms and Therapeutic Prospects. *J. Pharm. Anal.* **2023**, doi:10.1016/j.jpha.2023.12.010.
20. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2022. *CA. Cancer J. Clin.* **2022**, *72*, 7–33, doi:10.3322/caac.21708.
21. Bremner, J.B. An Update Review of Approaches to Multiple Action-Based Antibacterials. *Antibiotics* **2023**, *12*, 865, doi:10.3390/antibiotics12050865.
22. Niu, G.; Li, W. Next-Generation Drug Discovery to Combat Antimicrobial Resistance. *Trends Biochem. Sci.* **2019**, *44*, 961–972, doi:10.1016/j.tibs.2019.05.005.
23. Gupta, A.; Sharma, P.; Singh, T.P.; Sharma, S. Phosphopantetheine Adenylyltransferase: A Promising Drug Target to Combat Antibiotic Resistance. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2021**, *1869*, 140566, doi:10.1016/j.bbapap.2020.140566.
24. Xuan, J.; Feng, W.; Wang, J.; Wang, R.; Zhang, B.; Bo, L.; Chen, Z.-S.; Yang, H.; Sun, L. Antimicrobial Peptides for Combating Drug-Resistant Bacterial Infections. *Drug Resist. Updat.* **2023**, *68*, 100954, doi:10.1016/j.drup.2023.100954.
25. Spisz, P.; Chylewska, A.; Królicka, A.; Ramotowska, S.; Dąbrowska, A.; Makowski, M. Stimulation of Sulfonamides Antibacterial Drugs Activity as a Result of Complexation with Ru(III): Physicochemical and Biological Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13482, doi:10.3390/ijms222413482.
26. Tee, W.-V.; Berezovsky, I.N. Allosteric Drugs: New Principles and Design Approaches. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2024**, *84*, 102758, doi:10.1016/j.sbi.2023.102758.
27. Luukkonen, S.; van den Maagdenberg, H.W.; Emmerich, M.T.M.; van Westen, G.J.P. Artificial Intelligence in Multi-Objective Drug Design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2023**, *79*, 102537, doi:10.1016/j.sbi.2023.102537.

28. Young, R.J. Physical Properties in Drug Design. In *Tactics in Contemporary Drug Design*; Meanwell, N.A., Ed.; Topics in Medicinal Chemistry; Springer: Berlin, Heidelberg, 2015; pp. 1–68 ISBN 978-3-642-55041-6.
29. Valkó, K. Chapter 12 Measurements of Physical Properties for Drug Design in Industry. In *Handbook of Analytical Separations*; Valkó, K., Ed.; Separation Methods in Drug Synthesis and Purification; Elsevier Science B.V., 2000; Vol. 1, pp. 535–583.
30. Graves, O.K.; Kim, W.; Özcan, M.; Ashraf, S.; Turkez, H.; Yuan, M.; Zhang, C.; Mardinoglu, A.; Li, X. Discovery of Drug Targets and Therapeutic Agents Based on Drug Repositioning to Treat Lung Adenocarcinoma. *Biomed. Pharmacother.* **2023**, *161*, 114486, doi:10.1016/j.biopha.2023.114486.
31. Dai, X.-J.; Xue, L.-P.; Ji, S.-K.; Zhou, Y.; Gao, Y.; Zheng, Y.-C.; Liu, H.-M.; Liu, H.-M. Triazole-Fused Pyrimidines in Target-Based Anticancer Drug Discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *249*, 115101, doi:10.1016/j.ejmech.2023.115101.
32. D'mello, D.; Shivasharanappa, K.; Hanchinalmath, J.V.; Patil, S.J. Chapter 10 - In Silico Approaches in Drug Discovery for SARS-CoV-2. In *Coronavirus Drug Discovery*; Egbuna, C., Ed.; Drug Discovery Update; Elsevier, 2022; pp. 235–251 ISBN 978-0-323-95578-2.
33. Song, J.; Hu, M.; Zhou, J.; Xie, S.; Li, T.; Li, Y. Targeted Protein Degradation in Drug Development: Recent Advances and Future Challenges. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *261*, 115839, doi:10.1016/j.ejmech.2023.115839.
34. Lu, J.; Xu, X.; Sun, X.; Du, Y. Protein and Peptide-Based Renal Targeted Drug Delivery Systems. *J. Controlled Release* **2024**, *366*, 65–84, doi:10.1016/j.jconrel.2023.12.036.
35. Jaroensuk, J.; Chuaboon, L.; Kesornpun, C.; Chaiyen, P. Enzymes in Riboflavin Biosynthesis: Potential Antibiotic Drug Targets. *Arch. Biochem. Biophys.* **2023**, *748*, 109762, doi:10.1016/j.abb.2023.109762.
36. Jangra, N.; Kawatra, A.; Datten, B.; Gupta, S.; Gulati, P. Recent Trends in Targeted Delivery of Smart Nanocarrier-Based Microbial Enzymes for Therapeutic Applications. *Drug Discov. Today* **2024**, *29*, 103915, doi:10.1016/j.drudis.2024.103915.

37. Ghosh, M.; Hazarika, P.; Dhanya, S.J.; Pooja, D.; Kulhari, H. Exploration of Sialic Acid Receptors as a Potential Target for Cancer Treatment: A Comprehensive Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *257*, 128415, doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.128415.
38. Vikas; Mehata, A.K.; Suseela, M.N.L.; Behera, C.; Kumari, P.; Mahto, S.K.; Muthu, M.S. Chitosan-Alginate Nanoparticles of Cabazitaxel: Design, Dual-Receptor Targeting and Efficacy in Lung Cancer Model. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *221*, 874–890, doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.09.053.
39. Ojha, H.; Sethi, M.; Kakkar, R.; Sharma, M.; Saini, M.; Pathak, M. Chapter 7 - Chem-Bioinformatic Approach for Drug Discovery: In Silico Screening of Potential Antimalarial Compounds. In *Chemoinformatics and Bioinformatics in the Pharmaceutical Sciences*; Sharma, N., Ojha, H., Raghav, P.K., Goyal, R. k., Eds.; Academic Press, 2021; pp. 207–243 ISBN 978-0-12-821748-1.
40. Leng, X.; Zhang, M.; Xu, Y.; Wang, J.; Ding, N.; Yu, Y.; Sun, S.; Dai, W.; Xue, X.; Li, N.; et al. Non-Coding RNAs as Therapeutic Targets in Cancer and Its Clinical Application. *J. Pharm. Anal.* **2024**, doi:10.1016/j.jpha.2024.02.001.
41. Akhouri, V.; Majumder, S.; Gaikwad, A.B. Targeting DNA Methylation in Diabetic Kidney Disease: A New Perspective. *Life Sci.* **2023**, *335*, 122256, doi:10.1016/j.lfs.2023.122256.
42. Liao, H.; Cao, Y.; Hu, C.; Shen, S.; Zhang, Z.; Li, D.; Du, Y. Oxygen-Producing and pH-Responsive Targeted DNA Nanoflowers for Enhanced Chemo-Sonodynamic Therapy of Lung Cancer. *Mater. Today Bio* **2024**, *25*, 101005, doi:10.1016/j.mtbio.2024.101005.
43. Tolani, P.; Gupta, S.; Yadav, K.; Aggarwal, S.; Yadav, A.K. Chapter Four - Big Data, Integrative Omics and Network Biology. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Donev, R., Karabencheva-Christova, T., Eds.; Proteomics and Systems Biology; Academic Press, 2021; Vol. 127, pp. 127–160.
44. Aanniz, T.; Bouyahya, A.; Balahbib, A.; El Kadiri, K.; Khalid, A.; Makeen, H.A.; Alhazmi, H.A.; El Omari, N.; Zaid, Y.; Wong, R.S.-Y.; et al. Natural Bioactive Compounds Targeting DNA Methyltransferase Enzymes in Cancer: Mechanisms Insights and Efficiencies. *Chem. Biol. Interact.* **2024**, 110907, doi:10.1016/j.cbi.2024.110907.

45. Qu, Y.; Qin, S.; Yang, Z.; Li, Z.; Liang, Q.; Long, T.; Wang, W.; Zeng, D.; Zhao, Q.; Dai, Z.; et al. Targeting the DNA Repair Pathway for Breast Cancer Therapy: Beyond the Molecular Subtypes. *Biomed. Pharmacother.* **2023**, *169*, 115877, doi:10.1016/j.biopha.2023.115877.
46. Watanabe, K.; Seki, N. Biology and Development of DNA-Targeted Drugs, Focusing on Synthetic Lethality, DNA Repair, and Epigenetic Modifications for Cancer: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 752, doi:10.3390/ijms25020752.
47. Kumar, S.; Ahmad, M.; Waseem, M.; Pandey, A.K. Drug Targets for Cancer Treatment: An Overview. *Med. Chem.* **2015**, *5*, doi:10.4172/2161-0444.1000252.
48. Rehman, S.U.; Sarwar, T.; Husain, M.A.; Ishqi, H.M.; Tabish, M. Studying Non-Covalent Drug–DNA Interactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *576*, 49–60, doi:10.1016/j.abb.2015.03.024.
49. Brabec, V.; Kasparkova, J. Ruthenium Coordination Compounds of Biological and Biomedical Significance. DNA Binding Agents. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *376*, 75–94, doi:10.1016/j.ccr.2018.07.012.
50. Suh, D.; Chaires, J.B. Criteria for the Mode of Binding of DNA Binding Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 723–728, doi:10.1016/0968-0896(95)00053-J.
51. Silverman, R.B.; Holladay, M.W. Chapter 6 - DNA-Interactive Agents. In *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action (Third Edition)*; Silverman, R.B., Holladay, M.W., Eds.; Academic Press: Boston, 2014; pp. 275–331 ISBN 978-0-12-382030-3.
52. Nawaz, A.; Alfonso, E.; Deng, Z.; Leng, F. Targeting Bacterial DNA Gyrase and Topoisomerase IV *in Vitro* and *in Vivo* by a Newly Identified Quinazoline Gyrase Inhibitor. *Biophys. J.* **2024**, *123*, 77a, doi:10.1016/j.bpj.2023.11.535.
53. Gerhards, M.; Böhme, A.; Schubert, K.; Kodritsch, B.; Ulrich, N. DNA Adducts as Link between *in Vitro* and *in Vivo* Carcinogenicity – A Case Study with Benzo[*a*]Pyrene. *Curr. Res. Toxicol.* **2023**, *4*, 100097, doi:10.1016/j.crttox.2022.100097.
54. Tavakoli Hafshajani, K.; Sohrabi, N.; Eslami Moghadam, M.; Oftadeh, M. Spectroscopy and Molecular Dynamic Study of the Interaction of Calf Thymus DNA



- by Anticancer Pt Complex with Butyl Glycine Ligand. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2023**, *299*, 122826, doi:10.1016/j.saa.2023.122826.
55. Ponkarpagam, S.; Vennila, K.N.; Elango, K.P. Molecular Spectroscopic and Molecular Simulation Studies on the Interaction of Oral Contraceptive Drug Ormeloxifene with CT–DNA. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2022**, *278*, 121351, doi:10.1016/j.saa.2022.121351.
56. Ramotowska, S.; Brzeski, J.; Sumczyński, P.; Makowski, M.; Chylewska, A. Physicochemical and Electrochemical Characteristics of Pyrazine-2-Thiocarboxamide and Its Interaction Ability against Biomolecules. *Electrochimica Acta* **2021**, *394*, 139150, doi:10.1016/j.electacta.2021.139150.
57. Bayraktepe, D.E. A Voltammetric Study on Drug–DNA Interactions: Kinetic and Thermodynamic Aspects of the Relations between the Anticancer Agent Dasatinib and Ds-DNA Using a Pencil Lead Graphite Electrode. *Microchem. J.* **2020**, *157*, 104946, doi:10.1016/j.microc.2020.104946.
58. Staffler, R.; Pasternack, R.; Hils, M.; Kaiser, W.; Möller, F.M. Nucleotide Binding Kinetics and Conformational Change Analysis of Tissue Transglutaminase with switchSENSE. *Anal. Biochem.* **2020**, *605*, 113719, doi:10.1016/j.ab.2020.113719.
59. Narmuratova, Z.; Hentati, F.; Girardet, J.-M.; Narmuratova, M.; Cakir-Kiefer, C. Equine Lactoferrin: Antioxidant Properties Related to Divalent Metal Chelation. *LWT* **2022**, *161*, 113426, doi:10.1016/j.lwt.2022.113426.
60. Cléry, A.; Sohier, T.J.M.; Welte, T.; Langer, A.; Allain, F.H.T. switchSENSE: A New Technology to Study Protein–RNA Interactions. *Methods* **2017**, *118–119*, 137–145, doi:10.1016/j.ymeth.2017.03.004.
61. Ranallo, S.; Bracaglia, S.; Sorrentino, D.; Ricci, F. Synthetic Antigen-Conjugated DNA Systems for Antibody Detection and Characterization. *ACS Sens.* **2023**, *8*, 2415–2426, doi:10.1021/acssensors.3c00564.
62. Nowicka, P.; Brzeska, S.; Makowski, M. Exploring the Interactions of Biologically Active Compounds (Including Drugs) with Biomolecules: Utilizing Surface Plasmon Resonance and SwitchSense Techniques. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2024**, *176*, 117764, doi:10.1016/j.trac.2024.117764.

63. Nshimiyimana, M.; Habtu, M.; Manishimwe, F.; Ndayisenga, J.; Murekatete, A. Parental Knowledge, Attitudes and Practices on Antibiotics Use for Childhood Upper Respiratory Tract Infections in Kicukiro District, Rwanda. *J. Med. Nurs. Public Health* **2022**, *5*, 109–130, doi:10.53819/81018102t5062.
64. Alexander Fleming Discovery and Development of Penicillin – Landmark; online: <https://www.acs.org/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html> (dostęp z 1 marca 2024).
65. Wong, J. Dr. Alexander Fleming and the Discovery of Penicillin. *Prim. Care Update OBGYNS* **2003**, *10*, 124–126, doi:10.1016/S1068-607X(03)00006-4.
66. Gaynes, R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 849–853, doi:10.3201/eid2305.161556.
67. Tian, C.; Wang, K.; Zhang, X.; Li, G.; Lou, H.-X. Old Fusidane-Type Antibiotics for New Challenges: Chemistry and Biology. *Chin. J. Nat. Med.* **2022**, *20*, 81–101, doi:10.1016/S1875-5364(21)60114-0.
68. Lowbury, E.J.L.; Ayliffe, G.A.J.; Geddes, A.M.; Williams, J.D. Use of Antibiotics and Chemotherapeutic Agents. In *Control of Hospital Infection: A Practical Handbook*; Lowbury, E.J.L., Ayliffe, G.A.J., Geddes, A.M., Williams, J.D., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1981; pp. 187–211 ISBN 978-1-4899-6884-5.
69. Russell, A.D. Types of Antibiotics and Synthetic Antimicrobial Agents. In *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology*; Denyer, S.P., Hodges, N.A., Gorman, S.P., Eds.; Wiley, 2004; pp. 152–186 ISBN 978-0-632-06467-0.
70. Adeniyi ADEFEGHA, S. Antibiotics and Drug Pharmacology. *Acta Sci. Pharm. Sci.* **2019**, *3*, 43–49, doi:10.31080/ASPS.2019.03.0424.
71. Rodríguez-Melcón, C.; Alonso-Calleja, C.; García-Fernández, C.; Carballo, J.; Capita, R. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for Twelve Antimicrobials (Biocides and Antibiotics) in Eight Strains of *Listeria Monocytogenes*. *Biology* **2022**, *11*, 46, doi:10.3390/biology11010046.
72. Etebu, E.; Arikekpar, I. Antibiotics: Classification and Mechanisms of Action with Emphasis on Molecular Perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.* **2016**, *4*, 90–101.

73. Frank, U.; Tacconelli, E. Classification of the Antibiotics. In *The Daschner Guide to In-Hospital Antibiotic Therapy*; Frank, U., Tacconelli, E., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2012; pp. 1–4 ISBN 978-3-642-18402-4.
74. Waksman, S.A.; Woodruff, H.B. Bacteriostatic and Bactericidal Substances Produced by a Soil Actinomyces. *Exp. Biol. Med.* **1940**, *45*, 609–614, doi:10.3181/00379727-45-11768.
75. Ballou, H.C.; Goldbloom, A. CHEMOTHERAPY IN THE TREATMENT OF STREPTOCOCCUS INFECTIONS OF THE LUNG PLEURA AND CHEST WALL\*: (Prontosil and Prontylin). *J. Thorac. Surg.* **1937**, *7*, 153–180, doi:10.1016/S0096-5588(20)32279-0.
76. Joshi, S.R.; Salinas, W.; Khan, D.A. 50 - Drug Hypersensitivity. In *Clinical Immunology (Sixth Edition)*; Rich, R.R., Fleisher, T.A., Schroeder, H.W., Weyand, C.M., Corry, D.B., Puck, J.M., Eds.; Elsevier: New Delhi, 2023; pp. 630–647 ISBN 978-0-7020-8165-1.
77. Ovung, A.; Bhattacharyya, J. Sulfonamide Drugs: Structure, Antibacterial Property, Toxicity, and Biophysical Interactions. *Biophys. Rev.* **2021**, *13*, 259–272, doi:10.1007/s12551-021-00795-9.
78. Baran, A.; Kwiatkowska, A.; Potocki, L. Antibiotics and Bacterial Resistance—A Short Story of an Endless Arms Race. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24065777.
79. Zhou, J.; Yun, X.; Wang, J.; Li, Q.; Wang, Y. A Review on the Ecotoxicological Effect of Sulphonamides on Aquatic Organisms. *Toxicol. Rep.* **2022**, *9*, 534–540, doi:10.1016/j.toxrep.2022.03.034.
80. Zoppi, A.; Quevedo, M.A.; Delrivo, A.; Longhi, M.R. Complexation of Sulfonamides with Beta-Cyclodextrin Studied by Experimental and Theoretical Methods. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 3166–3176, doi:10.1002/jps.22062.
81. Ren, M. Voltammetric Determination of Sulfonamides in Milk. *Chem. Anal.* **2004**, *Vol. 49, No. 1*, 59–70.
82. Wan, Y.; Fang, G.; Chen, H.; Deng, X.; Tang, Z. Sulfonamide Derivatives as Potential Anti-Cancer Agents and Their SARs Elucidation. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *226*, 113837, doi:10.1016/j.ejmech.2021.113837.

83. Ochu, R.C.; Okoro, U.C.; Conradie, J.; Ugwu, D.I. New Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Agents Bearing Sulfonamide. *Eur. J. Med. Chem. Rep.* **2024**, *10*, 100136, doi:10.1016/j.ejmcr.2024.100136.
84. Kumar Verma, S.; Verma, R.; Xue, F.; Kumar Thakur, P.; Girish, Y.R.; Rakesh, K.P. Antibacterial Activities of Sulfonyl or Sulfonamide Containing Heterocyclic Derivatives and Its Structure-Activity Relationships (SAR) Studies: A Critical Review. *Bioorganic Chem.* **2020**, *105*, 104400, doi:10.1016/j.bioorg.2020.104400.
85. Boufas, W.; Dupont, N.; Berredjem, M.; Berrezag, K.; Bechecker, I.; Berredjem, H.; Aouf, N.-E. Synthesis and Antibacterial Activity of Sulfonamides. SAR and DFT Studies. *J. Mol. Struct.* **2014**, *1074*, 180–185, doi:10.1016/j.molstruc.2014.05.066.
86. Iwan, D.; Kamińska, K.; Denel-Bobrowska, M.; Olejniczak, A.B.; Wojaczyńska, E. Chiral Sulfonamides with Various *N*-Heterocyclic and Aromatic Units – Synthesis and Antiviral Activity Evaluation. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *153*, 113473, doi:10.1016/j.biopha.2022.113473.
87. Mao, P.; Deng, T.; Tian, J.; Liu, Y.; Xin, H.; An, Y.; Hu, Y.; Qin, Y.; Xue, W. Design, Synthesis, and Antifungal Activities of Chalcone Derivatives Containing Piperidine and Sulfonamide Moiety. *J. Saudi Chem. Soc.* **2024**, *28*, 101791, doi:10.1016/j.jscs.2023.101791.
88. Abdel-Aziz, A.A.-M.; Angeli, A.; El-Azab, A.S.; Hammouda, M.E.A.; El-Sherbeny, M.A.; Supuran, C.T. Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of Sulfonamides and Carboxylates Incorporating Trimellitimidates: Dual Cyclooxygenase/Carbonic Anhydrase Inhibitory Actions. *Bioorganic Chem.* **2019**, *84*, 260–268, doi:10.1016/j.bioorg.2018.11.033.
89. Chen, P.; Yang, J.; Zhou, Y.; Li, X.; Zou, Y.; Zheng, Z.; Guo, M.; Chen, Z.; Cho, W.-J.; Chattipakorn, N.; et al. Design, Synthesis, and Bioactivity Evaluation of Novel Amide/Sulfonamide Derivatives as Potential Anti-Inflammatory Agents against Acute Lung Injury and Ulcerative Colitis. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *259*, 115706, doi:10.1016/j.ejmech.2023.115706.
90. Ganguly, A.K.; Alluri, S.S.; Wang, C.-H.; Antropow, A.; White, A.; Carocchia, D.; Biswas, D.; Kang, E.; Zhang, L.-K.; Carroll, S.S.; et al. Structural Optimization of Cyclic Sulfonamide Based Novel HIV-1 Protease Inhibitors to Picomolar Affinities

- Guided by X-Ray Crystallographic Analysis. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 2894–2904, doi:10.1016/j.tet.2014.03.038.
91. Stranix, B.R.; Lavallée, J.-F.; Sévigny, G.; Yelle, J.; Perron, V.; LeBerre, N.; Herbart, D.; Wu, J.J. Lysine Sulfonamides as Novel HIV-Protease Inhibitors: *N* $\epsilon$ -Acyl Aromatic  $\alpha$ -Amino Acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3459–3462, doi:10.1016/j.bmcl.2006.04.011.
92. Sharma, R.; Soman, S.S. Design and Synthesis of Sulfonamide Derivatives of Pyrrolidine and Piperidine as Anti-Diabetic Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *90*, 342–350, doi:10.1016/j.ejmech.2014.11.041.
93. Abd El-Karim, S.S.; Anwar, M.M.; Syam, Y.M.; Nael, M.A.; Ali, H.F.; Motaleb, M.A. Rational Design and Synthesis of New Tetralin-Sulfonamide Derivatives as Potent Anti-Diabetics and DPP-4 Inhibitors: 2D & 3D QSAR, *in Vivo* Radiolabeling and Bio Distribution Studies. *Bioorganic Chem.* **2018**, *81*, 481–493, doi:10.1016/j.bioorg.2018.09.021.
94. Sudha Rani, M.; Krishnadevi, K.; Rajeswari, M.; Somaiah, N. Design, Synthesis and Anticancer Activity of Sulfonamide Derivatives of 1,2,3-Triazole-Indoles. *Chem. Data Collect.* **2023**, *43*, 100975, doi:10.1016/j.cdc.2022.100975.
95. El Omari, N.; Bakrim, S.; Khalid, A.; Albratty, M.; Abdalla, A.N.; Lee, L.-H.; Goh, K.W.; Ming, L.C.; Bouyahya, A. Anticancer Clinical Efficiency and Stochastic Mechanisms of Belinostat. *Biomed. Pharmacother.* **2023**, *165*, 115212, doi:10.1016/j.biopha.2023.115212.
96. Kenny, R.G.; Ude, Z.; Docherty, J.R.; Marmion, C.J. Vorinostat and Belinostat, Hydroxamate-Based Anti-Cancer Agents, Are Nitric Oxide Donors. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *206*, 110981, doi:10.1016/j.jinorgbio.2019.110981.
97. Ketron, A.C.; Denny, W.A.; Graves, D.E.; Osheroff, N. Amsacrine as a Topoisomerase II Poison: Importance of Drug-DNA Interactions. *Biochemistry* **2012**, *51*, 1730–1739, doi:10.1021/bi201159b.
98. Jangir, D.K.; Dey, S.K.; Kundu, S.; Mehrotra, R. Assessment of Amsacrine Binding with DNA Using UV–Visible, Circular Dichroism and Raman Spectroscopic Techniques. *J. Photochem. Photobiol. B* **2012**, *114*, 38–43, doi:10.1016/j.jphotobiol.2012.05.005.

99. Alyar, S.; Bilkan, M.T.; Karataş, M.F.; Bilkan, Ç.; Alyar, H. Experimental and Theoretical Studies on a New Sulfonamide Derivative and Its Copper Complex: Synthesis, FT-IR, NMR, DFT, Molecular Docking and in Silico Investigations. *J. Mol. Struct.* **2024**, *1302*, 137531, doi:10.1016/j.molstruc.2024.137531.
100. Witkowska, D.; Słowik, J.; Chilicka, K. Heavy Metals and Human Health: Possible Exposure Pathways and the Competition for Protein Binding Sites. *Molecules* **2021**, *26*, 6060, doi:10.3390/molecules26196060.
101. P Gupta, S. Roles of Metals in Human Health. *MOJ Bioorganic Org. Chem.* **2018**, *2*, doi:10.15406/mojboc.2018.02.00085.
102. Moustakas, M. The Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry and Medicine. *Materials* **2021**, *14*, 549, doi:10.3390/ma14030549.
103. Soliman, S.M.; Al-Rasheed, H.H.; Albering, J.H.; El-Faham, A. Fe(III) Complexes Based on Mono- and Bis-Pyrazolyl-s-Triazine Ligands: Synthesis, Molecular Structure, Hirshfeld, and Antimicrobial Evaluations. *Molecules* **2020**, *25*, 5750, doi:10.3390/molecules25235750.
104. Turecka, K.; Chylewska, A.; Rychłowski, M.; Zakrzewska, J.; Waleron, K. Antibacterial Activity of Co(III) Complexes with Diamine Chelate Ligands against a Broad Spectrum of Bacteria with a DNA Interaction Mechanism. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 946, doi:10.3390/pharmaceutics13070946.
105. Lenis-Rojas, O.A.; Cordeiro, S.; Horta-Meireles, M.; Fernández, J.A.A.; Fernández Vila, S.; Rubiolo, J.A.; Cabezas-Sainz, P.; Sanchez, L.; Fernandes, A.R.; Royo, B. N-Heterocyclic Carbene Iron Complexes as Anticancer Agents: In Vitro and In Vivo Biological Studies. *Molecules* **2021**, *26*, 5535, doi:10.3390/molecules26185535.
106. Gai, S.; He, L.; He, M.; Zhong, X.; Jiang, C.; Qin, Y.; Jiang, M. Anticancer Activity and Mode of Action of Cu(II), Zn(II), and Mn(II) Complexes with 5-Chloro-2-N-(2-Quinolylmethylene)Aminophenol. *Molecules* **2023**, *28*, 4876, doi:10.3390/molecules28124876.
107. Hunter, T.M.; Paisey, S.J.; Park, H.; Cleghorn, L.; Parkin, A.; Parsons, S.; Sadler, P.J. Configurations of Metalloacyclams and Relevance to Anti-HIV Activity. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 713–719, doi:10.1016/j.jinorgbio.2003.10.018.

108. Garoufis, A.; Hadjikakou, S.K.; Hadjiliadis, N. Palladium Coordination Compounds as Anti-Viral, Anti-Fungal, Anti-Microbial and Anti-Tumor Agents. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1384–1397, doi:10.1016/j.ccr.2008.09.011.
109. Sahar, Y.J.; Mohammed, H.; Al-Abady, Z.N. Synthesis and Characterization of New Metal Complexes Containing Azo-Indole Moiety and Anti-Leukemia Human (HL-60) Study of Its Palladium (II) Complex. *Results Chem.* **2023**, *5*, 100847, doi:10.1016/j.rechem.2023.100847.
110. Almodares, Z.; Lucas, S.J.; Crossley, B.D.; Basri, A.M.; Pask, C.M.; Hebden, A.J.; Phillips, R.M.; McGowan, P.C. Rhodium, Iridium, and Ruthenium Half-Sandwich Picolinamide Complexes as Anticancer Agents. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 727–736, doi:10.1021/ic401529u.
111. Kushwaha, R.; Kumar, A.; Saha, S.; Bajpai, S.; Yadav, A.K.; Banerjee, S. Os(II) Complexes for Catalytic Anticancer Therapy: Recent Update. *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 4825–4836, doi:10.1039/D2CC00341D.
112. Tolbatov, I.; Marrone, A.; Coletti, C.; Re, N. Computational Studies of Au(I) and Au(III) Anticancer Metalodrugs: A Survey. *Molecules* **2021**, *26*, 7600, doi:10.3390/molecules26247600.
113. Kar, B.; Roy, N.; Pete, S.; Moharana, P.; Paira, P. Ruthenium and Iridium Based Mononuclear and Multinuclear Complexes: A Breakthrough of Next-Generation Anticancer Metallopharmaceuticals. *Inorganica Chim. Acta* **2020**, *512*, 119858, doi:10.1016/j.ica.2020.119858.
114. Tolbatov, I.; Umari, P.; Marzo, T.; Chiaverini, L.; La Mendola, D.; Marrone, A. The Binding of Auranofin at DNA/RNA Nucleobases: A DFT Assessment. *Chem. Phys. Lett.* **2024**, *842*, 141197, doi:10.1016/j.cplett.2024.141197.
115. Kenny, R.G.; Marmion, C.J. Toward Multi-Targeted Platinum and Ruthenium Drugs—A New Paradigm in Cancer Drug Treatment Regimens? *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 1058–1137, doi:10.1021/acs.chemrev.8b00271.
116. Khan, T.-M.; Gul, N.S.; Lu, X.; Kumar, R.; Choudhary, M.I.; Liang, H.; Chen, Z.-F. Rhodium(III) Complexes with Isoquinoline Derivatives as Potential Anticancer Agents: In Vitro and in Vivo Activity Studies. *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 11469–11479, doi:10.1039/C9DT01951K.

117. Gramni, L.; Vukea, N.; Chakraborty, A.; Samson, W.J.; Dingle, L.M.K.; Xulu, B.; de la Mare, J.-A.; Edkins, A.L.; Booyesen, I.N. Anticancer Evaluation of Ruthenium(III) Complexes with N-Donor Ligands Tethered to Coumarin or Uracil Moieties. *Inorganica Chim. Acta* **2019**, *492*, 98–107, doi:10.1016/j.ica.2019.04.018.
118. Yawson, G.K.; Huffman, S.E.; Fisher, S.S.; Bothwell, P.J.; Platt, D.C.; Jones, M.A.; Ferrence, G.M.; Hamaker, C.G.; Webb, M.I. Ruthenium(III) Complexes with Imidazole Ligands That Modulate the Aggregation of the Amyloid- $\beta$  Peptide via Hydrophobic Interactions. *J. Inorg. Biochem.* **2021**, *214*, 111303, doi:10.1016/j.jinorgbio.2020.111303.
119. Omondi, R.O.; Jaganyi, D.; Ojwach, S.O.; Fatokun, A.A. (Pyridyl)Benzoazole Ruthenium(III) Complexes: Kinetics of Ligand Substitution Reaction and Potential Cytotoxic Properties. *Inorganica Chim. Acta* **2018**, *482*, 213–220, doi:10.1016/j.ica.2018.06.020.
120. Jayakumar, T.; Hsu, C.-Y.; Khamrang, T.; Hsia, C.-H.; Hsia, C.-W.; Manubolu, M.; Sheu, J.-R. Possible Molecular Targets of Novel Ruthenium Complexes in Antiplatelet Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1818, doi:10.3390/ijms19061818.
121. Eswaran, J.; Mariappan, A.; Arumugham, N.; Murugan, T.; Bhuvanesh, N. sp; Anathakrishnan, N.M.; Daniel, S.; Kanthapazham, R. Ruthenium(III) and (II) Complexes Containing Pyridine Moiety: Synthesis, Crystal Structure and in Vitro Biological Evaluation. *J. Mol. Struct.* **2022**, *1270*, 133929, doi:10.1016/j.molstruc.2022.133929.
122. Katheria, S. Ruthenium Complexes as Potential Cancer Cell Growth Inhibitors for Targeted Chemotherapy. *ChemistrySelect* **2022**, *7*, e202201645, doi:10.1002/slct.202201645.
123. Peng, Y.-B.; Tao, C.; Tan, C.-P.; Zhao, P. Mitochondrial Targeted Rhodium(III) Complexes: Synthesis, Characterized and Antitumor Mechanism Investigation. *J. Inorg. Biochem.* **2021**, *218*, 111400, doi:10.1016/j.jinorgbio.2021.111400.
124. Lin, M.; Zou, S.; Li, T.; Karges, J.; Chen, Y.; Zhao, Y.; Ji, L.; Chao, H. Chiral Rhodium(III)–Azobenzene Complexes as Photoswitchable DNA Molecular Locks. *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 4324–4327, doi:10.1039/D2CC00932C.



125. Peng, Y.-B.; He, W.; Niu, Q.; Tao, C.; Zhong, X.-L.; Tan, C.-P.; Zhao, P. Mitochondria-Targeted Cyclometalated Rhodium(III) Complexes: Synthesis, Characterization and Anticancer Research. *Dalton Trans.* **2021**, *50*, 9068–9075, doi:10.1039/D1DT01053K.
126. Ma, D.-L.; Liu, L.-J.; Leung, K.-H.; Chen, Y.-T.; Zhong, H.-J.; Chan, D.S.-H.; Wang, H.-M.D.; Leung, C.-H. Antagonizing STAT3 Dimerization with a Rhodium(III) Complex. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9178–9182, doi:10.1002/anie.201404686.
127. Esteghamat-Panah, R.; Hadadzadeh, H.; Farrokhpour, H.; Simpson, J.; Abdolmaleki, A.; Abyar, F. Synthesis, Structure, DNA/Protein Binding, and Cytotoxic Activity of a Rhodium(III) Complex with 2,6-Bis(2-Benzimidazolyl)Pyridine. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 958–971, doi:10.1016/j.ejmech.2016.11.005.
128. Mollin, S.; Riedel, R.; Harms, K.; Meggers, E. Octahedral Rhodium(III) Complexes as Kinase Inhibitors: Control of the Relative Stereochemistry with Acyclic Tridentate Ligands. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *148*, 11–21, doi:10.1016/j.jinorgbio.2015.01.005.
129. Ossowski, T.; Goulart, M.O.F.; Abreu, F.C. de; Sant'Ana, A.E.G.; Miranda, P.R.B.; Costa, C. de O.; Liwo, A.; Falkowski, P.; Zarzeczanska, D. Determination of the pKa Values of Some Biologically Active and Inactive Hydroxyquinones. *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 175–183, doi:10.1590/S0103-50532008000100025.
130. Chylewska, A.; Jacewicz, D.; Zarzeczanska, D.; Chmurzyński, L. Determination of Dissociation Constants for Coordination Compounds of Cr(III) and Co(III) Using Potentiometric and Spectrophotometric Methods. *J. Chem. Thermodyn.* **2008**, *40*, 1290–1294, doi:10.1016/j.jct.2008.03.012.
131. Kostrowicki, J.; Liwo, A. Determination of Equilibrium Parameters by Minimization of an Extended Sum of Squares. *Talanta* **1990**, *37*, 645–650, doi:10.1016/0039-9140(90)80211-W.
132. Kostrowicki, J.; Liwo, A. A General Method for the Determination of the Stoichiometry of Unknown Species in Multicomponent Systems from Physicochemical Measurements. *Comput. Chem.* **1987**, *11*, 195–210, doi:10.1016/0097-8485(87)80018-9.

133. Krapcho, A.P.; Shaw, K.J. Synthesis and Rearrangements of Dihydro-1,4-Oxazepine and Dihydro-1,4-Thiazepine Derivatives. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3341–3343, doi:10.1021/jo00167a041.
134. Reagents - Dynamic Biosensors; online: <https://www.dynamic-biosensors.com/reagents/> (dostęp z 1 marca 2024)
135. Benesi, H.A.; Hildebrand, J.H. A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2703–2707, doi:10.1021/ja01176a030.
136. Chai, J.-D.; Head-Gordon, M. Long-Range Corrected Hybrid Density Functionals with Damped Atom–Atom Dispersion Corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6615–6620, doi:10.1039/B810189B.
137. Krishnan, R.; Binkley, J.S.; Seeger, R.; Pople, J.A. Self-consistent Molecular Orbital Methods. XX. A Basis Set for Correlated Wave Functions. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 650–654, doi:10.1063/1.438955.
138. Barone, V.; Cossi, M. Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995–2001, doi:10.1021/jp9716997.
139. Miertuš, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. Electrostatic Interaction of a Solute with a Continuum. A Direct Utilizaion of AB Initio Molecular Potentials for the Prevision of Solvent Effects. *Chem. Phys.* **1981**, *55*, 117–129, doi:10.1016/0301-0104(81)85090-2.
140. Marenich, A.V.; Cramer, C.J.; Truhlar, D.G. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378–6396, doi:10.1021/jp810292n.
141. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; et al. *Gaussian 16*; Revision C.01. Gaussian, Inc.: Wallingford CT 2016
142. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.;Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with

- Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791, doi:10.1002/jcc.21256.
143. Macke, T.J.; Case, D.A. Modeling Unusual Nucleic Acid Structures. In *Molecular Modeling of Nucleic Acids*; ACS Symposium Series; American Chemical Society, 1997; Vol. 682, pp. 379–393 ISBN 978-0-8412-3541-0.
144. Zgarbová, M.; Šponer, J.; Otyepka, M.; Cheatham, T.E.I.; Galindo-Murillo, R.; Jurečka, P. Refinement of the Sugar–Phosphate Backbone Torsion Beta for AMBER Force Fields Improves the Description of Z- and B-DNA. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 5723–5736, doi:10.1021/acs.jctc.5b00716.
145. Case, D. A.; Babin, V.; Berryman, J.; Betz, R. M.; Cai, Q.; Cerutti, D. S.; Cheatham, T.; Darden, T.; Duke, R.; Gohlke, H.; et al. *AMBER 14*, University of California: San Francisco; 2014.
146. Gasteiger, J.; Marsili, M. Iterative Partial Equalization of Orbital Electronegativity—a Rapid Access to Atomic Charges. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3219–3228, doi:10.1016/0040-4020(80)80168-2.
147. Zeng, Q.; Jones, M.R.; Brooks, B.R. Absolute and Relative pKa Predictions via a DFT Approach Applied to the SAMPL6 Blind Challenge. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2018**, *32*, 1179–1189, doi:10.1007/s10822-018-0150-x.
148. Muckerman, J.T.; Skone, J.H.; Ning, M.; Wasada-Tsutsui, Y. Toward the Accurate Calculation of pKa Values in Water and Acetonitrile. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2013**, *1827*, 882–891, doi:10.1016/j.bbabi.2013.03.011.
149. Ciura, K.; Fedorowicz, J.; Andrić, F.; Žuvela, P.; Greber, K.E.; Baranowski, P.; Kawczak, P.; Nowakowska, J.; Bączek, T.; Sączewski, J. Lipophilicity Determination of Antifungal Isoxazolo[3,4-b]Pyridin-3(1H)-Ones and Their N1-Substituted Derivatives with Chromatographic and Computational Methods. *Molecules* **2019**, *24*, 4311, doi:10.3390/molecules24234311.
150. Salvador, P.; Mayer, I. Energy Partitioning for “Fuzzy” Atoms. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 5046–5052, doi:10.1063/1.1646354.
151. Yang, L.; Dordick, J.S.; Garde, S. Hydration of Enzyme in Nonaqueous Media Is Consistent with Solvent Dependence of Its Activity. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 812–821, doi:10.1529/biophysj.104.041269.

152. Partanen, J.I. Calculation of the First and Second Stoichiometric Dissociation Constants of Glycine in Aqueous Sodium Chloride Solutions at 298.15 K. *Berichte Bunsenges. Für Phys. Chem.* **1998**, *102*, 855–865, doi:10.1002/bbpc.19981020611.
153. Şanlı, S.; Altun, Y.; Şanlı, N.; Alsancak, G.; Beltran, J.L. Solvent Effects on pKa Values of Some Substituted Sulfonamides in Acetonitrile-Water Binary Mixtures by the UV-Spectroscopy Method. *J. Chem. Eng. Data* **2009**, *54*, 3014–3021, doi:10.1021/je9000813.
154. Qiang, Z.; Adams, C. Potentiometric Determination of Acid Dissociation Constants (pKa) for Human and Veterinary Antibiotics. *Water Res.* **2004**, *38*, 2874–2890, doi:10.1016/j.watres.2004.03.017.
155. Mansour, A.M. Molecular Structure and Spectroscopic Properties of Novel Manganese(II) Complex with Sulfamethazine Drug. *J. Mol. Struct.* **2013**, *1035*, 114–123, doi:10.1016/j.molstruc.2012.09.048.
156. Refat, M.S.; Sharshar, T.; Elsabawy, K.M.; El-Sayed, M.Y.; Adam, A.M.A. Synthesis, Physicochemical Characterization and Anticancer Screening of Sulfa Drug Ruthenium Complexes as Anticancer Agent. *J. Mol. Liq.* **2016**, *222*, 334–349, doi:10.1016/j.molliq.2016.07.006.
157. Shah, S.S.A.; Ashfaq, M.; Najam, T.; Ahmed, M.; Shaheen, S.; Tabassum, R.; Ejaz, S. Synthesis of Sulfonamides, Metal Complexes and the Study of In Vitro Biological Activities. *Curr. Bioact. Compd.* **2013**, *9*, doi:10.2174/157340720903140119152646.
158. Hangan, A.C.; Borodi, G.; Stan, R.L.; Páll, E.; Cenariu, M.; Oprean, L.S.; Sevastre, B. Synthesis, Crystal Structure, DNA Cleavage and Antitumor Activity of Two Copper(II) Complexes with N-Sulfonamide Ligand. *Inorganica Chim. Acta* **2018**, *482*, 884–893, doi:10.1016/j.ica.2018.07.045.
159. Antonarakis, E.S.; Emadi, A. Ruthenium-Based Chemotherapeutics: Are They Ready for Prime Time? *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, *66*, 1–9, doi:10.1007/s00280-010-1293-1.
160. Li, X.; Heimann, K.; Li, F.; Warner, J.M.; Keene, F.R.; Collins, J.G. Dinuclear Ruthenium(II) Complexes Containing One Inert Metal Centre and One

- Coordinatively-Labile Metal Centre: Syntheses and Biological Activities. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 4017–4029, doi:10.1039/C5DT04885K.
161. Waring, M.J. Complex Formation between Ethidium Bromide and Nucleic Acids. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 269–282, doi:10.1016/S0022-2836(65)80096-1.
162. Vardevanyan, P.O.; Antonyan, A.P.; Parsadanyan, M.A.; Davtyan, H.G.; Karapetyan, A.T. The Binding of Ethidium Bromide with DNA: Interaction with Single- and Double-Stranded Structures. *Exp. Mol. Med.* **2003**, *35*, 527–533, doi:10.1038/emmm.2003.68.
163. Banerjee, A.; Majumder, P.; Sanyal, S.; Singh, J.; Jana, K.; Das, C.; Dasgupta, D. The DNA Intercalators Ethidium Bromide and Propidium Iodide Also Bind to Core Histones. *FEBS Open Bio* **2014**, *4*, 251–259, doi:10.1016/j.fob.2014.02.006.
164. Mishra, A.; Ekka, M.K.; Maiti, S. Influence of Ionic Liquids on Thermodynamics of Small Molecule–DNA Interaction: The Binding of Ethidium Bromide to Calf Thymus DNA. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 2691–2700, doi:10.1021/acs.jpcc.5b11823.
165. Andrezálová, L.; Országhová, Z. Covalent and Noncovalent Interactions of Coordination Compounds with DNA: An Overview. *J. Inorg. Biochem.* **2021**, *225*, 111624, doi:10.1016/j.jinorgbio.2021.111624.
166. Galindo-Murillo, R.; Cheatham, T.E., III Ethidium Bromide Interactions with DNA: An Exploration of a Classic DNA–Ligand Complex with Unbiased Molecular Dynamics Simulations. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 3735–3747, doi:10.1093/nar/gkab143.
167. Biało-brzeska, W.; Niedziałkowski, P.; Malinowska, N.; Cebula, Z.; Ossowski, T. Analysis of Interactions between Calf Thymus DNA and 1,5-Di(Piperazin-1-Yl)Anthracene-9,10-Dione Using Spectroscopic and Electrochemical Methods. *J. Mol. Liq.* **2019**, *289*, 111080, doi:10.1016/j.molliq.2019.111080.
168. Garbett, N.C.; Hammond, N.B.; Graves, D.E. Influence of the Amino Substituents in the Interaction of Ethidium Bromide with DNA. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 3974–3981, doi:10.1529/biophysj.104.047415.

169. Kaiser, W.; Rant, U. Conformations of End-Tethered DNA Molecules on Gold Surfaces: Influences of Applied Electric Potential, Electrolyte Screening, and Temperature. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7935–7945, doi:10.1021/ja908727d.
170. Geggier, S.; Kotlyar, A.; Vologodskii, A. Temperature Dependence of DNA Persistence Length. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 1419–1426, doi:10.1093/nar/gkq932.
171. Friedland, J.S. Chapter 30 - Tuberculosis and Other Mycobacterial Infections. In *Infectious Diseases (Third Edition)*; Cohen, J., Opal, S.M., Powderly, W.G., Eds.; Mosby: London, 2010; pp. 309–327 ISBN 978-0-323-04579-7.
172. Nuhoglu, Y.; Nuhoglu, C. Aminophylline for Treating Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Expert Rev. Respir. Med.* **2008**, *2*, 305–313, doi:10.1586/17476348.2.3.305.
173. Vieira, M.; Pinheiro, C.; Fernandes, R.; Noronha, J.P.; Prudêncio, C. Antimicrobial Activity of Quinoxaline 1,4-Dioxide with 2- and 3-Substituted Derivatives. *Microbiol. Res.* **2014**, *169*, 287–293, doi:10.1016/j.micres.2013.06.015.
174. Predvoditeleva, G.S.; Kartseva, T.V.; Oleshko, O.N.; Shvedov, V.I.; Pershin, G.N.; Zykova, T.N.; Lapaeva, N.B. Pyridazinoquinoxalines. V. Synthesis and Study of the Tuberculostatic Activity of Alkyl Derivatives of Dihydropyridazino[3,4-b]Quinoxalines. *Pharm. Chem. J.* **1977**, *11*, 1349–1353, doi:10.1007/BF01152242.
175. Singh, I.; Luxami, V.; Paul, K. Effective Synthesis of Benzimidazoles-Imidazo[1,2-*a*]Pyrazine Conjugates: A Comparative Study of Mono-and Bis-Benzimidazoles for Antitumor Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *180*, 546–561, doi:10.1016/j.ejmech.2019.07.042.
176. Xu, H.; Fan, L. Synthesis and Antifungal Activities of Novel 5,6-Dihydro-Indolo[1,2-*a*]Quinoxaline Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1919–1925, doi:10.1016/j.ejmech.2011.02.035.
177. Bien, H.-S.; Stawitz, J.; Wunderlich, K. Anthraquinone Dyes and Intermediates. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 2000 ISBN 978-3-527-30673-2.

178. Singh, T.; Pandey, V.K.; Dash, K.K.; Zanwar, S.; Singh, R. Natural Bio-Colorant and Pigments: Sources and Applications in Food Processing. *J. Agric. Food Res.* **2023**, *12*, 100628, doi:10.1016/j.jafr.2023.100628.
179. Malik, M.S.; Alsantali, R.I.; Jassas, R.S.; Alsimaree, A.A.; Syed, R.; Alsharif, M.A.; Kalpana, K.; Morad, M.; Althagafi, I.I.; Ahmed, S.A. Journey of Anthraquinones as Anticancer Agents – a Systematic Review of Recent Literature. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 35806–35827, doi:10.1039/D1RA05686G.
180. Wartell, R.M.; Larson, J.E.; Wells, R.D. Netropsin: A SPECIFIC PROBE FOR A-T REGIONS OF DUPLEX DEOXYRIBONUCLEIC ACID. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 6719–6731, doi:10.1016/S0021-9258(19)42119-4.
181. Finlay, A.C.; Hochstein, F.A.; Sobin, B.A.; Murphy, F.X. Netropsin, a New Antibiotic Produced by a Streptomyces. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 341–343, doi:10.1021/ja01145a113.
182. Chylewska, A.; Sikorski, A.; Ogryzek, M.; Makowski, M. Attractive S $\cdots$  $\pi$  and  $\pi$ - $\pi$  Interactions in the Pyrazine-2-Thiocarboxamide Structure: Experimental and Computational Studies in the Context of Crystal Engineering and Microbiological Properties. *J. Mol. Struct.* **2016**, *1105*, 96–104, doi:10.1016/j.molstruc.2015.10.032.
183. Baliyan, S.; Mukherjee, R.; Priyadarshini, A.; Vibhuti, A.; Gupta, A.; Pandey, R.P.; Chang, C.-M. Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of Ficus Religiosa. *Molecules* **2022**, *27*, 1326, doi:10.3390/molecules27041326.

## Załączniki

### Informacje o aktywności naukowej

Studia w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Gdańskiego w dyscyplinie Nauki Chemiczne rozpoczęłam w październiku 2020 roku. Badania realizowałam w Katedrze Chemii Bionieorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką promotora prof. dr. hab. Mariusza Makowskiego oraz promotora pomocniczego dr Sandry Brzeskiej.

Jestem współautorką 9 publikacji naukowych, w tym w 6 pełnię rolę pierwszego autora. Wzięłam udział w 4 konferencjach naukowych międzynarodowych oraz 4 krajowych, w tym na 3 z nich przedstawiłam wyniki w formie posteru, natomiast na 5 wygłosiłam referaty ustne. Jestem również współautorką 12 referatów ustnych i plakatów przedstawianych przez osoby, z którymi współpracowałam.

Do tej pory odbyłam dwa krótkie pobyty naukowe, odpowiednio tydzień i 10 dni, na Wydziale Chemii Lwowskiego Narodowego Uniwersytetu im. Iwana Franki Ukraina (2020) oraz Wydziale Chemii Uniwersytetu Florenckiego we Włoszech (2023). Ponadto jestem współautorką dwóch zgłoszeń patentowych.

Pełniłam rolę wykonawcy w dwóch projektach finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki OPUS oraz ubiegałam się o finansowanie w ramach projektu PRELUDIUM. Byłam również kierownikiem projektu służącemu Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Doktorantów – BMN oraz projektu małych grantów – Ugrants-start finansowanych przez Uniwersytet Gdański. Obecnie również realizuję kolejny projekt BMN oraz ubiegam się o finansowanie na wyjazd na konferencję zagraniczną w konkursie PROM NAWA.

W ramach badań realizowanych w Szkole Doktorskiej zajmowałam się syntezą pochodnych sulfonamidowych, ich połączeń koordynacyjnych z trójwartościowymi jonami rutenu i rodu oraz analizie fizykochemicznej tych związków. Zajmowałam się również określaniem siły oddziaływania cząsteczek z helisą DNA oraz kinetyki zachodzących procesów przy pomocy techniki switchSENSE. W tej tematyce naukowej powstało 5 publikacji, które są podstawą niniejszej dysertacji.



**Publikacje**

1. **Aleksandra Ciesielska**, Jakub Brzeski, Dorota Zarzeczańska, Magdalena Stasiuk, Mariusz Makowski, Sandra Brzeska “*Exploring the interaction of biologically active compounds with DNA using the SwitchSense technique, UV-Vis spectroscopy, and computational methods*” Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc. **2024**, 124313, (DOI:10.1016/j.saa.2024.124313)
2. Jakub Brzeski, **Aleksandra Ciesielska**, Mariusz Makowski „*A theoretical study of the alkylamino substituted sulfonamides with potential biological activity*” J. Phys. Chem. B, **2023**, (DOI:10.1021/acs.jpcc.3c05618)
3. Sandra Ramotowska, Paulina Spisz, Jakub Brzeski, **Aleksandra Ciesielska**, Mariusz Makowski „*Application of the SwitchSense Technique for the Study of Small Molecules’ (Ethidium Bromide and Selected Sulfonamide Derivatives) Affinity to DNA in Real Time*” J. Phys. Chem. B, **2022**, (DOI:10.1021/acs.jpcc.2c03138)
4. **Aleksandra Ciesielska**, Małgorzata Gawrońska, Mariusz Makowski, Sandra Ramotowska "Sulfonamides differing in the alkylamino substituent length – synthesis, electrochemical characteristic, acid-base profile and complexation properties" Polyhedron, **2022**, (DOI:10.1016/j.poly.2022.115868)
5. Sandra Ramotowska, **Aleksandra Ciesielska**, Mariusz Makowski "What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions?" Molecules, **2021**, (DOI:10.3390/molecules26113478)
6. **Aleksandra Ciesielska**, Wojciech Ciesielski, Karen Khachatryan, Henryk Koloczek, Damian Kulawik, Zdzisław Oszczyda, Jacek Soroka, Piotr Tomasik „*Structure and Physicochemical Properties of Water Treated Under Methane with Low-Temperature Glow Plasma of Low Frequency*” Water, **2020**, (DOI:10.3390/w12061638)
7. **Aleksandra Ciesielska**, Wojciech Ciesielski, Beata Girek, Tomasz Girek, Kinga Kozieł, Damian Kulawik, Jakub Łągiewka „*Biomedical application of cyclodextrin polymers cross-linked via dianhydrides of carboxylic acids*” Applied Sciences, **2020**, (DOI: 10.3390/app10238463)
8. **Aleksandra Ciesielska**, Wojciech Ciesielski, Henryk Kołoczek, Damian Kulawik, Joanna Kończyk, Zdzisław Oszczyda, Piotr Tomasik „*Structure and Physicochemical Properties*

*of Water Treated under Ammonia with Lowtemperature Low-pressure Glow Plasma of Low Frequency*” Open Chemistry, **2020**, (DOI: 10.1515/chem-2020-0166)

9. **Aleksandra Ciesielska**, Wojciech Ciesielski, Karen Khachatryan, Henryk Koloczek, Damian Kulawik, Zdzisław Oszczyda, Jacek Soroka, Piotr Tomasik „*Structure and Physicochemical Properties of Water Treated under Carbon Dioxide with Low-Temperature Low-Pressure Glow Plasma of Low Frequency*” Water, **2020**, (DOI:10.3390/w12071920)

### Konferencje

1. **A. Ciesielska**, S. Brzeska, M. Makowski: „*Wpływ długości łańcucha alkiloaminowego wybranych pochodnych sulfonamidowych na ich właściwości fizykochemiczne oraz zdolność do wiązania z helisą DNA*”, 66. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, PTChem, Poznań, 15-20 września 2024 – **referat wygłoszony**
2. A. Chylewska, A. Dąbrowska, M. Kowalik, J. Brzeski, S. Brzeska, **A. Ciesielska**, P. Nowicka, M. Makowski: „*Eksperymentalne i teoretyczne badania połączeń koordynacyjnych wybranych jonów trójwartościowych z ligandami sulfonamidowymi*”, Ogólnopolska Konferencja Naukowa Chemia-Biznes-Środowisko “ChemBiŚ”, Gdańsk, 8-9 czerwca 2024 – **wykład wygłoszony przez prof. dr. hab. Mariusza Makowskiego**
3. **A. Ciesielska**, S. Brzeska, M. Makowski: "*Badanie procesów kinetycznych związków wysoko- i niskocząsteczkowych z helisą DNA przy wykorzystaniu techniki switchSENSE*", XX Ogólnopolskie Seminarium Studentów i Doktorantów „Na pograniczu Chemii, Biologii i Farmacji”, Jarnołtówek, 26-29 maj 2024 – **referat wygłoszony**
4. **A. Ciesielska**, J. Brzeski, D. Zarzeczkańska, M. Stasiuk, M. Makowski, S. Brzeska: "*Badanie oddziaływania związków biologicznie czynnych z DNA z wykorzystaniem techniki SwitchSense, spektroskopii UV-Vis oraz metod obliczeniowych*", XX Ogólnopolskie Seminarium Studentów i Doktorantów „Na pograniczu Chemii, Biologii i Farmacji”, Jarnołtówek, 26-29 maj 2024 – **referat wygłoszony przez Magdalenę Stasiuk**

5. J. Brzeski, **A. Ciesielska**, M. Makowski: "*A theoretical study on the alkylimino substituted sulfonamides*", 2nd French-Polish Chemistry Congress, Montpellier, 28-31 Sierpień 2023 – **referat wygłoszony przez dr. Jakuba Brzeskiego**
6. **A. Ciesielska**, **S. Brzeska**, M. Makowski: "*Determination of low-molecular compounds interactions with DNA biomolecule using switchSENSE technology*", 2nd French-Polish Chemistry Congress, Montpellier, 28-31 Sierpień 2023 – **referat wygłoszony**
7. **A. Ciesielska**, **S. Brzeska**, **M. Makowski**: „*Profil elektrochemiczny pochodnych sulfonamidowych różniących się długością podstawnika alkiloaminowego*”, XIX Ogólnopolskie Seminarium Doktorantów i Studentów „Na pograniczu chemii i biologii”, Trzebieszowice, 4-7 czerwiec 2023 – **referat wygłoszony**
8. J. Brzeski, S. Brzeska, P. Spisz, **A. Ciesielska**, M. Makowski: "*Wyznaczanie parametrów fizykochemicznych oddziaływania małych cząsteczkowych związków z DNA z wykorzystaniem techniki switchSense i metod obliczeniowych*", VI Otwarte Seminarium (Webinarium) "Od teorii do eksperymentu", Online-Wrocław, luty 2023 – **współautorstwo referatu ustnego wygłoszonego przez dr. Jakuba Brzeskiego**
9. **A. Ciesielska**, S. Ramotowska, P. Spisz, J. Brzeski, M. Makowski: „*The Affinity of Small Molecules to DNA – Optimization of the New Innovative Switchsense Technology*”, Modeling and Design of Molecular Materials 2022, Wrzesień, Gdańsk – **poster**
10. A. Chylewska, J. Brzeski, A. Dąbrowska, M. Kowalik A. Królicka, S. Ramotowska, P. Spisz, **A. Ciesielska**, M. Makowski: „*Importance of Structure-Activity Relationship (SAR) Studies of Sulfonamide Moiety in Current and Future Therapy*”, Modeling and Design of Molecular Materials 2022, Wrzesień, Gdańsk – **współautorstwo referatu ustnego wygłoszonego przez prof. dr. hab. Mariusza Makowskiego**
11. **A. Ciesielska**, S. Ramotowska, M. Makowski: „*Influence of the methoxy group position in sulfonamide ligands on their acid-base properties*”, Materials, Methods & Technologies, Burgas, Sierpień 2022 – **poster**
12. **A. Ciesielska**, **S. Ramotowska**, **M. Makowski**: „*Influence of the aliphatic chain length of sulfonamide derivatives on complexing properties toward Ru(III) and*

- Rh(III) ions*", French-Polish Symposium on Chemistry, Paryż, Maj 2022 – **referat wygłoszony**
13. **A. Ciesielska, S. Ramotowska, M. Gawrońska, M. Makowski:** *"Synteza i właściwości fizykochemiczne podstawionych grupą metoksyłową pochodnych sulfonamidowych"*, IV Ogólnopolskie Forum Chemii Nieorganicznej, Toruń, Wrzesień 2021 - **poster**
  14. **W. Ciesielski, D. Kulawik, J. Drabowicz, S. Żarska, A. Ciesielska, K. Kozieł:** *"New eco-friendly batteries based on carbon nanotubes"*, 5th Polish Conference „Graphene and 2D materials”, Szczecin, Wrzesień 2019 – **współautorstwo referatu ustnego wygłoszonego przez prof. dr. hab. Wojciecha Ciesielskiego**
  15. **D. Kulawik, W. Ciesielski, A. Ciesielska, K. Kozieł, V. Pavliuk:** *"New hybrid materials based on carbon nanotubes and metal alloys"*, 5th Polish Conference „Graphene and 2D materials”, Szczecin, Wrzesień 2019 – **poster zaprezentowany przez dr. Damiana Kulawika**
  16. **D. Kulawik, W. Ciesielski, S. Żarska, A. Folentarska, A. Ciesielska:** *"New hybrid materials based on carbon nanotubes and metal alloys"*, 22th International Conference on composite materials (ICCM22), Melbourne, Wrzesień 2019 – **współautorstwo referatu ustnego wygłoszonego przez dr. Damiana Kulawika**
  17. **D. Kulawik, J. Drabowicz, W. Ciesielski, S. Zdanowska, A. Folentarska, A. Ciesielska, V. Pavliuk:** *"New hybrid materials based on carbon nanotubes and metal alloys"*, International Conference on Nano-Material, Engineering Applications, Manufacturing and Applied Sciences, Bangkok, Luty 2019 – **współautorstwo referatu ustnego wygłoszonego przez dr. Damiana Kulawika**
  18. **W. Ciesielski, D. Kulawik, S. Zdanowska, A. Folentarska, A. Ciesielska, V. Pavliuk, J. Drabowicz:** *"Battery prototype with a cell based on carbon nanostructures"*, International Conference on Nano-Material, Engineering Applications, Manufacturing and Applied Sciences, Bangkok, Luty 2019 – **współautorstwo referatu ustnego wygłoszonego przez prof. dr. hab. Wojciecha Ciesielskiego**
  19. **A. Folentarska, D. Kulawik, J. Kończyk, A. Ciesielska, M. Caban, J. Kumirska, W. Ciesielski:** *"Usuwanie leków w komunalnych oczyszczalniach ścieków przy użyciu biowęgla"*, IX Kongres Technologii Chemicznej, Gdańsk, Wrzesień 2018 – **poster zaprezentowany przez mgr Agnieszkę Folentarską**

20. D. Kulawik, W. Ciesielski, **A. Ciesielska**, V. Pavliuk: "*Siarkowe struktury węglowe w bateriach - super pojemne baterie*", IX Kongres Technologii Chemicznej, Gdańsk, Wrzesień 2018 – **poster zaprezentowany przez dr. Damiana Kulawika**

### Zgłoszenia patentowe

1. **Aleksandra Ciesielska**, Edyta Girek-Rynkiewicz, Beata Kulawik, Igor Jatulewicz, Izabela Maruszewska, Adam Maruszewski, „*Piwo wzbogacone substancjami odżywczymi i sposób jego wytwarzania*”, zgłoszenie patentowe z dnia 2.12.2019, numer zgłoszenia: P.432040, zgłaszający: BROWAR RECRAFT spółka z ograniczoną odpowiedzialnością, Świętochłowice
2. Dariusz Michalski, **Aleksandra Ciesielska**, Edyta Girek-Rynkiewicz, „*Płyn katalizujący do spalania paliw stałych, oraz sposób wytwarzania płynu katalizującego*”, zgłoszenie patentowe z dnia 17.11.2020, numer zgłoszenia: P.435998, zgłaszający: MICHALSKI DARIUSZ MDM-KONTAKT, Ocice

### Staż naukowe

1. **Lwowski Narodowy Uniwersytet im. Iwana Franki**, Wydział Chemii  
„*Investigations in the field of materials for hydrogen storage systems based on carbon nanotubes and carbonate*”  
Termin stażu: 10.02.2020 – 16.02.2020
2. **Uniwersytet Florencki**, Wydział Chemii  
„*HPLC-MS analysis of endocrine disruptors in biological fluids*”  
Termin stażu: 8.05.2023 – 19.05.2023

### Projekty naukowe

1. Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki OPUS nr UMO-2019/33/B/ST4/00031: „*Synteza i właściwości biochemiczne pochodnych antybiotyków sulfonamidowych z analizą zmian profili bionieorganicznych wskutek kompleksowania z trójwartościowymi jonami metali (Ru, Rh, Os, Ir)*” – **wykonawca** od października 2020 roku do września 2021 roku

2. Projekt służący Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Doktorantów nr 539-T120-B009-22: „*Badanie wpływu długości łańcucha alifatycznego pochodnych sulfonamidowych na zdolności kompleksotwórcze z trójwartościowymi jonami rutenu(III) oraz rodu(III)*” – **kierownik** w roku 2022
3. Projekt małych grantów – UGrants nr 533-0C20-GS33-23: „*Exploring the interaction of biologically active compounds with DNA through the application of the SwitchSense technique, UV-Vis spectroscopy, and computational methods*” – **kierownik** w roku 2023
4. Projekt służący Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Doktorantów nr 539-T120-B009-22: „*Potencjalne wykorzystanie polimerów cyklodekstrynowych w terapii binarnej, a ich zdolność do oddziaływania z biomolekułą DNA*” – **kierownik** w roku 2024
5. Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki OPUS nr UMO-2023/49/B/NZ7/03456: „*Związki modulujące funkcje białek telomerowych TRF1 i TRF2*” – **wykonawca** od 2024 roku do 2026 roku

## **Pełne wersje publikacji**





Review

# What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions?

Sandra Ramotowska, Aleksandra Ciesielska and Mariusz Makowski \*

Department of Bioinorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk, Poland; sandra.ramotowska@ug.edu.pl (S.R.); olaciesielska50@gmail.com (A.C.)

\* Correspondence: mariusz.makowski@ug.edu.pl

**Abstract:** The interactions of compounds with DNA have been studied since the recognition of the role of nucleic acid in organisms. The design of molecules which specifically interact with DNA sequences allows for the control of the gene expression. Determining the type and strength of such interaction is an indispensable element of pharmaceutical studies. Cognition of the therapeutic action mechanisms is particularly important for designing new drugs. Owing to their sensitivity, simplicity, and low costs, electrochemical methods are increasingly used for this type of research. Compared to other techniques, they require a small number of samples and are characterized by a high reliability. These methods can provide information about the type of interaction and the binding strength, as well as the damage caused by biologically active molecules targeting the cellular DNA. This review paper summarizes the various electrochemical approaches used for the study of the interactions between pharmaceuticals and DNA. The main focus is on the papers from the last decade, with particular attention on the voltammetric techniques. The most preferred experimental approaches, the electrode materials and the new methods of modification are presented. The data on the detection ranges, the binding modes and the binding constant values of pharmaceuticals are summarized. Both the importance of the presented research and the importance of future prospects are discussed.

**Keywords:** DNA–drug interactions; drug analysis; electrochemical methods; cyclic voltammetry; differential pulse voltammetry



**Citation:** Ramotowska, S.; Ciesielska, A.; Makowski, M. What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions? *Molecules* **2021**, *26*, 3478. <https://doi.org/10.3390/molecules26113478>

Academic Editors: Antonio Monari and Domenico Diella

Received: 16 April 2021

Accepted: 4 June 2021

Published: 7 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

### 1.1. Interactions between Pharmaceuticals and DNA Chain

Deoxyribonucleic acid (DNA) plays an important role in the functioning of life, as it carries the genetic information of living organisms and some viruses. Since the recognition of the role of nucleic acids in living organisms, the effect of various substances on their structure and function has been studied. Understanding the mechanism of the interaction between the pharmaceuticals and the DNA chain is key to biological research, as it enables the necessary information for pharmaceutical design and development processes to be obtained [1–6].

The two DNA strands are linked primarily through hydrogen bonds between complementary nucleobases. Small molecules interact with the DNA helix in several different ways (Figure 1), which primarily include intercalation, major and minor groove interaction, and nonspecific electrostatic interactions with the negatively charged nucleic acid sugar–phosphate structures, as well as covalent bonding [3,7].

Intercalation is a type of noncovalent interaction with DNA involving spatially flat systems sliding in between base pairs in the double nucleic acid helix. The compounds that interact this way generally have flat aromatic or heteroaromatic ring system(s) with a thickness of about 0.2–0.4 nm. As a result of intercalation, the aforesaid systems are positioned perpendicularly to the helical axis. The formed adduct is stabilized by the interactions of the flat aromatic systems with the DNA nitrogenous bases. Intercalators

generally do not exhibit base sequence specificity, but are preferably located at sites with a predominance of GC (guanine–cytosine) base pairs instead. After the intercalation process, the primary and secondary DNA structures remain unchanged. Nonetheless, a change occurs in the tertiary structure. Namely, the helix torsion angle bends and the DNA strand becomes stiffened and elongated. An example of a typical intercalator is amsacrine [3,8–10]. The combination of two intercalating planar units linked by an alkyl chain gives to more complex bifunctional compounds, called thread-like bis-intercalators (e.g., bis-acridines [11]). In addition, molecules that are composed of three or more such systems have been designed. These compounds are characterized by an increased affinity compared to conventional intercalators, and thus have improved therapeutic properties. Threading intercalation is an unusual mode of DNA binding with significantly lower association and dissociation rates compared to classical intercalation [12,13].

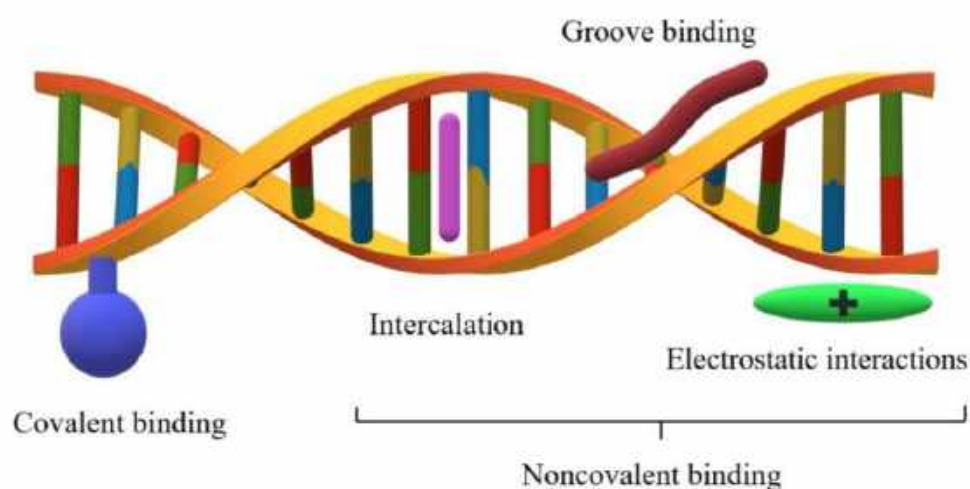


Figure 1. Types of interactions between molecules and the DNA chain.

Crystallographic studies indicate that under physiological conditions, the DNA double helix is structurally similar to the model form B DNA (10.5 base pairs per turn), the surface of which contains two grooves. The region where the two strands are close to each other is called a minor groove, while the region where the two strands are away from each other is called a major groove. Their dimensions and geometry are therefore important recognition elements for the ligands to bind correctly to DNA. The DNA phosphate–sugar skeleton is flexible, which allows the torsion degree of the double helix to change depending on certain factors. This flexibility is also affected by the number of hydrogen bonds between the complementary bases. The regions rich in GC, the base pairs are more “rigid” compared to the base pairs that are rich in AT (adenine–thymine). A high conformational lability of the ligand structure is required to adjust the compound according to the shape of the groove. A characteristic feature of these compounds is the presence of several single rings connected by a short linker. The stability of the complex formed this way is characterized by the physicochemical interactions (usually hydrogen bonds) between the functional groups of the ligand and the functional groups within the small groove. The compounds interacting with the DNA in the small groove usually have a greater affinity toward the regions rich in AT base pairs. [3,14,15]. Moreover, the molecules that are composed of both polycyclic systems and elastic side chains interact with the DNA helix by intercalation and by binding to the DNA grooves. An example of such compounds is actinomycin D [16].

### 1.2. Techniques Used to Describe DNA–Molecule Interactions

Prior to *in vivo* research, the interactions between pharmaceutical molecules and DNA can be determined in the chemical laboratory, using the following techniques: spectroscopic methods (NMR [17–19], IR [19,20], Raman [21,22], and UV–Vis spectroscopy [23–29], linear and circular dichroism [19,20,29], spectrofluorimetry [2,25,27–29]), mass spectrometry [30,31], equilibrium dialysis [32], surface plasmon resonance (SPR) [33,34], and to some extent, molecular modeling techniques [1,3,6,35,36]. All the above-mentioned methods are generally applicable in the assessment of the position, strength, and mechanism of the interaction, which in turn are crucial to understanding the drug's mechanism of action. Each of these techniques has a certain range of applicability and information that it can provide.

The equilibrium dialysis method can be used to measure the amount of ligand bound to a macromolecule [37]. Additionally, the binding isotherms and Scatchard plots used to compare the binding parameters of a drug to nucleosomes and DNA can be estimated from such an experiment as well [32]. However, equilibrium dialysis is an indirect method and requires the support of other techniques to describe the interactions in a comprehensive manner. SPR is an optical technique that allows the concentration of biomolecules to be determined by measuring the changes in the light refraction parameters. The basis of the SPR is the interaction of an incoming light source with a thin metallic film in close contact with a prism or grating. In order to detect an interaction, one molecule is immobilized onto the sensor surface and its binding partner is injected in a sample buffer [37–39]. The main advantages of SPR over other methods is that no labeling is required, the amount of both ligand and analyte needed to obtain satisfying results is low, and the experiment is relatively rapid. On the other hand, the limitation of this technique is that it cannot verify the stability of the complex formed during drug binding to DNA [34]. Structural analysis tools coupled with molecular modelling techniques have had a considerable impact on the understanding of the microscopic structural heterogeneity of DNA and constitute a basis for compound–DNA recognition. However, these techniques are primarily used to study the adduct structure rather than determining the bond constant values [19,31,36]. Spectrophotometric techniques are useful due to their low sample consumption and their ability to provide information regarding the binding affinity. Changes in the spectrum of the studied drug in the presence of different DNA concentrations allow the DNA–drug binding mode and the value of binding constant [25] to be determined. However, they cannot be used for compounds which do not have absorption maxima in the tested range or their absorption maximum coincides with the maximum absorption of DNA. If the properties of the studied compound allow it, both spectroscopic and electrochemical methods are used to describe the interactions as fully as methodologically possible [24]. Electrochemical techniques are extremely advantageous in the case of compounds that cannot be studied and described by either UV–Vis or fluorescence spectroscopy because of limitations such as the weak intensity of absorption/fluorescence maxima or the overlap of the electronic transition bands of the studied compound with the electronic transition bands of the DNA.

The recent increase in the use of electrochemical methods is due to their numerous advantages, the most important being a high sensitivity, selectivity in relation to electroactive molecules and a wide range of linearity. On the other hand, ergonomic advantages are related to the relatively low costs of both the measuring equipment and the single analysis itself, the low harmfulness of the reagents used in the analysis and the short time needed to perform the experiment. Compared to the other methods, these techniques require only a small amount of the sample and are characterized by a high reliability [1]. The apparatus used in this technique is portable and the electrodes can be modified to increase the sensitivity and can be miniaturized for mass production. Changes in the electrochemical parameters registered with the use of voltammetric techniques provide a large amount of information about the studied process. The binding of the drug to a cellular target can be converted into a useful electrical signal, electron transfer, and a potential or impedance change at the electrode–solution interface. Due to the similarity between the

electrochemical and the biological redox processes, the oxidation mechanisms occurring at the electrode and in the body may share similar principles [40].

## 2. Electrochemical Approach to DNA–Drug Interaction Description

### 2.1. Principles of Measurement with Electrochemical Techniques

The binding of a pharmaceutical compound with DNA is most often observed by differences in the redox process (electrochemical behavior) of a given drug in the absence and presence of DNA. Changes mainly include the shifts in the formal potential of the redox couple and the decrease in the peak current, resulting from the sudden decrease in the diffusion coefficient after binding to DNA [1]. The voltammetric methods involving the electrolysis of the diffusion layer and the current measurements ( $I$  [A]) versus the applied electrode potential ( $E$  [V]) are widely used.

To observe and interpret the signals from the DNA–molecule adduct, it is important to understand the electrochemical behavior of both the studied compound and the DNA. All DNA bases are oxidized at the glassy carbon electrode (GCE). Guanine and adenine bases are oxidized at much lower positive potentials compared to cytosine and thymine. For example, in the Satana et al. [41] experiment, the double-strand DNA (dsDNA) exhibited two well-defined peaks in an acetate buffer with a pH of 4.5, which were observed by differential pulse voltammetry (DPV). The peaks corresponded to the oxidation reactions of deoxyguanosine (dGuo) and deoxyadenosine (dAdo), at the potential values ( $E_{pa}$ ) of +0.98 V and +1.24 V, respectively. The oxidation of adenine and guanine is a two-step process associated with the loss of four electrons and four protons.

### 2.2. Types of Electrodes and Research Approaches

In voltammetric measurements, a three-electrode measuring system consisting of a working electrode, a reference electrode (Ag/AgCl or saturated calomel electrode), and an auxiliary electrode (Pt wire) is used. The stationary working electrode is composed of various types of electrode materials. The most common are glassy carbon electrodes (GCEs) [42–49], pencil graphite electrodes (PGEs) [50–56], carbon paste electrodes (CPEs) [57,58], hanging mercury drop electrodes (HMDEs) [59], platinum electrodes [60], and gold electrodes [61,62]. These electrodes can be used either in the bare form [44,54,63] or modified with a layer capable of increasing their sensitivity [50–53,55,56].

In addition, the approach to conducting the experiment can vary depending on the electrochemical techniques used. Such analysis often involves examining the electrochemical behavior of a pharmaceutical in a solution to which DNA is gradually added. Consequently, the impact of the subsequent portions (increasing the DNA concentration) on the redox processes of the examined system is determined [24,26,44,46,59,63]. An alternative method is the modification of the electrode, which involves immobilizing one of the analyzed system elements (studied compound with biological activity [64] or DNA [41,42,57,61–63,65,66]) on the surface of the working electrode. The last-mentioned approach is often used to obtain DNA biosensor systems for monitoring drug interactions.

### 2.3. Electrochemical Biosensors

A chemical sensor is a device that transforms chemical information into an analytically useful signal. The recognition system utilizes a biochemical mechanism in biosensors [67]. They usually contain two basic components: a molecular recognition system (receptor) and a physicochemical transducer [68], or an electrochemical transducer in the case of an electrochemical biosensor that can be considered a chemically modified electrode [69]. This integrated receptor-transducer device is able to provide selective and quantitative analytical information using a biological recognition element. An electrochemical DNA-based biosensor in turn, is a device that integrates nucleic acids as the biological recognition element and integrates an electrode as the physicochemical transducer [70–73].

There are several types of natural and synthetic DNA and RNA molecules available for electrochemical biosensors, including chromosomal DNA as well as well-defined viral or plasmid nucleic acids. Their preparation method is of great practical importance. This allows the sensor to be prepared for the appropriate application. Electrochemical biosensors are also widely used outside the analysis of DNA–molecule interactions in the detection and quantification of chemicals such as drugs, metabolites, pollutants, biomarkers etc [69,74–78].

### 3. Electrochemical Methods Applied

#### 3.1. Cyclic Voltammetry (CV)

Cyclic voltammetry (CV) is widely used for determining the interactions of small biologically active molecules with DNA [2,3,24,26,42,59,61,79–82]. During the measurement, a linearly changing potential is applied to the working electrode. When the target value of the potential is reached, a change in the electrode polarization direction takes place. This allows the reversibility of the analyzed redox process to be observed. The potentiostat enables the precise polarization of the working electrode and the measurement of the current flowing between it and the reference electrode. The shape of the resulting voltammogram is influenced by the type of redox system studied and the conditions of the measurement. The primary factors determining the voltammogram form are the speed of the depolarizer molecules transported to the electrode surface and the speed at which the electrode functions (kinetics of the oxidation/reduction process). In fact, the electrode does not function until the applied potential reaches the specific value at which the redox reaction occurs, which is manifested by an increase in the current. The driving force of this process is diffusion, which is caused by a gradient of the analyte concentration in the electrode layer and in the further part of the solution. Over time, the ions from further layers of the solution must reach the electrode; in other words, the number of depolarizer particles reaching the electrode decreases. Thus, the current decreases after reaching the maximum value. Subsequently, the recorded signal reaches its peak, which is indicated by the values of “peak potential” ( $E_p$ ) and “peak current” ( $I_p$ ) [83,84]. CV is often used to describe the chemical characteristics of compounds [85]. It provides information, for example, on the effect of protonation and the formation of hydrogen bonds on redox processes [86]. It also determines the acid dissociation constants [87] and acts as a tool for analyzing the complexation process [88].

CV is one of the voltammetric techniques which allows for the prediction and evaluation of the interactions, the binding strength, and the DNA damage caused by biologically active molecules targeting the cellular DNA. The most important information provided by these methods are: (i) the diffusion coefficient values of both the molecule and its adduct with DNA; (ii) the binding affinity, which is expressed as the value of the binding constant ( $K$ ); (iii) the type of interaction mode; and (iv) the size of the binding site ( $s$ ) where the drug–DNA interactions occur.

The diffusion coefficient of the electroactive species can be determined using the dependencies defined by the Randles–Ševčík equation (for 25 °C temp.):

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^2 \cdot A \cdot C \cdot D^{1/2} \cdot \nu^{1/2} \quad (1)$$

where  $n$  is the number of electrons transferred during the redox process,  $A$  is the electrode area in  $\text{cm}^2$ ,  $D$  is the diffusion coefficient in  $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ,  $C$  is the concentration in  $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ , and  $\nu$  is the scan rate in  $\text{V/s}$ . Moreover, the linear plots of  $I_p$  vs.  $\nu^{1/2}$  provide evidence for a diffusion-limited mechanism of the redox process. The value of the binding constant can be determined from the following equation:

$$\log(1/[DNA]) = \log K + \log(I/I_0 - I) \quad (2)$$

where  $K$  is the binding constant, and  $I_0$  and  $I$  are the peak currents of the studied redox process in the absence and presence of DNA, respectively. The binding constant is easily

calculated from the intercept of the plot of  $\log(1/[DNA])$  versus  $\log(I/(I_0 - I))$ . A high  $K$  value suggests intercalation-based interactions, whereas a low value implies a rather weaker groove or electrostatic interactions. The type of interaction mode can also be determined by the potential shift direction. The binding site size indicates the number of free base pairs in dsDNA interacting with the studied compound. This can be determined by performing a linear regression analysis of the experimental data according to the following equations:

$$\frac{C_b}{C_f} = \frac{K [DNA]}{2s} \quad (3)$$

$$\frac{C_b}{C_f} = \frac{I - I_{DNA}}{I_{DNA}} \quad (4)$$

where  $C_b/C_f$  is the concentration ratio of the bound and free compounds and  $s$  is the size of the binding site.

The essential parameters of all the research on the electrochemical aspects of the DNA–drug interactions described in the paper are summarized in Table 1. It presents the applied electrochemical methods, the electrode materials, and the media in which the discussed studies were conducted. Moreover, it contains the values of the limits of detection (LOD) and/or the limits of quantitation (LOQ), and the binding constant, as well as information about a suggested interaction mechanism.

**Table 1.** Essential parameters of the described electrochemical research. Each column refers to: author, compound/drug studied, drug group, electrochemical method, type of electrode and medium used, respectively. Moreover, it contains the values of LOD/LOQ and the binding constant, as well as information about a suggested interaction mechanism.

Author [Ref.]	Compound/Drug	Drug Group	Method	Electrode	Medium	LOD/LOQ	Binding Constant	Interaction Mechanism
Satana et al. [41]	Clofarabine (CLF)	Anticancer	CV, DPV, SWV	GCE	pH4.5 ABS	0.08 $\mu$ M	NS	NS
Biakbrazeska et al. [24]	1,5-di(piperazin-1-yl)anthracene-9,10-dione	Anticancer	CV	GCE	pH7.4 PBS	NS	$1.94 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	Intercalation
Qin et al. [40]	ortho-5-fluorouracil meta-5-fluorouracil	Anticancer	CV	ctDNA/Au	pH7.2 TBS	NS	$2.33 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ $1.45 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	Groove
Bayrakdepe [54]	Doxatinib (DSB)	Anticancer	CV, DPV	ICE	pH4.8 ABS	NS	$2.51 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	Intercalation
Jabeen et al. [42]	morin (mor) quercetin (quer) primuletin (prim)	Potentially anticancer (Flavonoids)	CV	GCE	pH7.4 PBS	NS	$9.01 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ $4.82 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ $0.88 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	Intercalation Groove Electrostatic
	Cu–morin (Cu–mor) Fe–morin (Fe–mor) Cu–quercetin (Cu–quer) Fe–quercetin (Fe–quer) Cu–primuletin (Cu–prim) Fe–primuletin (Fe–prim)	(Flavonoids complexes)	CV	GCE	pH7.4 PBS	NS	$12.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ $0.33 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ $0.92 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ $0.89 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ $18.02 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ $9.89 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	Intercalation Electrostatic Electrostatic Electrostatic Intercalation Intercalation
Buoro et al. [43]	Gemcitabine (GEM)	Anticancer	DPV	GCE, dsDNA/GCE	pH4.5 ABS	NS	NS	NS
Diculescu et al. [45]	Danuserib	Anticancer	DPV	GCE, dsDNA/GCE	pH4.5 ABS	NS	NS	Electrostatic and forms a complex
Dindar et al. [47]	Citalopram (CIT) S-enantiomer—escitalopram (ESC)	Antidepressant	DPV	GCE	pH4.7 ABS	NS	$5.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ $8.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	Groove or electrostatic

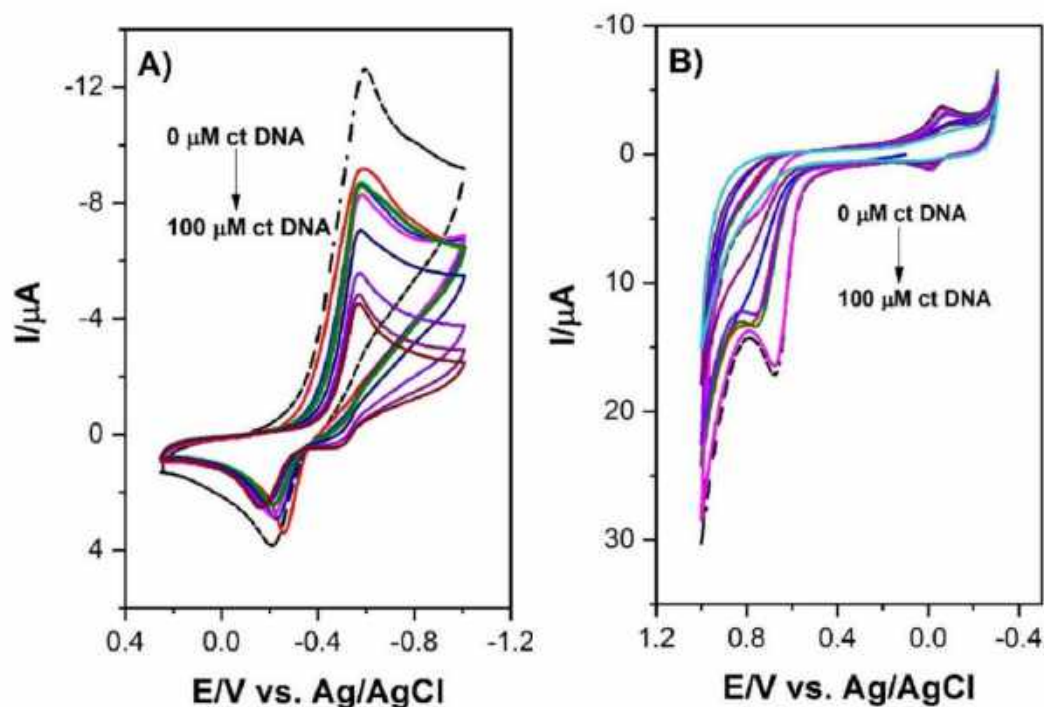
Table 1. Cont.

Author [Ref.]	Compound/Drug	Drug Group	Method	Electrode	Medium	LOD/LOQ	Binding Constant	Interaction Mechanism
Porkarapagan et al. [49]	Rosiglitazone (RG)	Antidiabetic	CV, DPV	GCE	pH7.3 TBS	NS	$3.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	Groove
Eksin et al. [51]	Daunorubicin (DNR)	Anticancer	ES, DPV	cQD-PGE	pH4.8 ABS	0.02 µg/mL	NS	NS
Fındık et al. [53]	Daunorubicin (DNR)	Anticancer	DPV	NFs-PGE	pH4.8 ABS	2.93 µM	NS	NS
Fındık et al. [52]	Mitomycin C (MC)	Anticancer	DPV	NFs-PGE	pH4.8 ABS	12.55 µg/mL	NS	NS
Bolat [35]	Irinotecan (CPT-11)	Anticancer	DPV	poly(CTAB-MWCNTs)/PGE	pH4.8 ABS	1.03 µg/mL	$6.84 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	Groove
Imiszek et al. [48]	IPBD Cl-IPBD	Anticancer	DPV, ACV	spUC19/GCE	pH4.7 ABS	NS	NS	NS
Congur et al. [56]	Daunorubicin (DNR)	Anticancer	DPV	LVN-PGE	pH4.8 ABS	510 nM	NS	Intercalation
Invar et al. [58]	Amsacrine	Anticancer	DPV	Er <sup>3+</sup> -doped NiO/CPEs	pH7.0 PBS	0.05 µM	NS	Intercalation
Kumar et al. [60]	[Mn <sub>2</sub> C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] [Fe <sub>2</sub> C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] [Co <sub>2</sub> C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] [Ni <sub>2</sub> C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	Antibacterial	CV, DPV	Pt	pH7.2 TBS	NS	$3.19 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ NS $4.23 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ $3.69 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$	Intercalation
Temek et al. [59]	Flutamide (Flu)	Anticancer	CV, SWV	HMDE	pH7.4 TBS	NS	$1.70 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	Intercalation
Tajik et al. [50]	Taxol	Anticancer	DPV	dsDNA/PGE	pH4.8 ABS	$8.0 \times 10^{-8} \text{ M}$	NS	Intercalation

Abbreviations included in the table: NS—not stated; CV—cyclic voltammetry; DPV—differential pulse voltammetry; SWV—square wave voltammetry; GCE—glassy carbon electrode; PGE—pencil graphite electrode; CPE—carbon paste electrode; EIS—electrochemical impedance spectroscopy; ACV—alternating current voltammetry; Pt—platinum electrode; HMDE—hanging mercury drop electrode; ABS—acetate buffer solution; PBS—phosphate buffer solution; TBS—tris buffer solution.

In their studies on 1,5-di(piperazin-1-yl)anthracene-9,10-dione (1,5-ppz-AQ), Bialobrzeska et al. [24] determined the intercalation mechanism by both spectroscopic and electrochemical methods. The intensity of the studied anthraquinone derivative cathode peak highly decreased (from  $I = 10 \mu\text{A}$  to  $I = 0.4 \mu\text{A}$ ) with an increased DNA concentration (up to 100 µM) (Figure 2). Moreover, the lower values of the diffusion coefficient determined for 1,5-ppz-AQ in the presence of *calothrix* DNA (ctDNA) confirmed the formation of an adduct. The value of the binding constant was calculated from the intercept of the plot of  $\log(1/[\text{DNA}])$  versus  $\log(I/(I_0 - I))$  (Figure 3). The linear fitting of the voltammetric data yielded the  $K$  values  $1.94 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  and  $1.96 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  for 1,5-ppz-AQ and ethidium bromide (measured by the same method for comparison), respectively. These values indicated that the compounds had a high affinity to the DNA. Furthermore, the linear fit analysis yielded a site size  $s$  of 1.08. A higher binding constant value of 1,5-ppz-AQ, compared to the values of the various intercalating drugs that are clinically used (epirubicin, mitoxantrone, etc.), suggests its potential use as an anticancer drug.

The lower values found for the binding constant ( $K$ ) between the studied compound and the DNA chain indicate the groove bonding interaction mode. Qin et al. [89] determined the binding constants of two 5-fluorouracil derivatives that interacted with nucleic acid ( $K = 2.33 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  and  $K = 1.45 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  for *ortho*- and *meta*-substituted derivatives, respectively). Moreover, molecular docking was utilized to simulate the modes of the interactions between the drugs and the DNA. The obtained results demonstrated that the studied compounds acted as groove binders and interacted with the nucleic acid chain by binding to the minor groove of the DNA double helix.



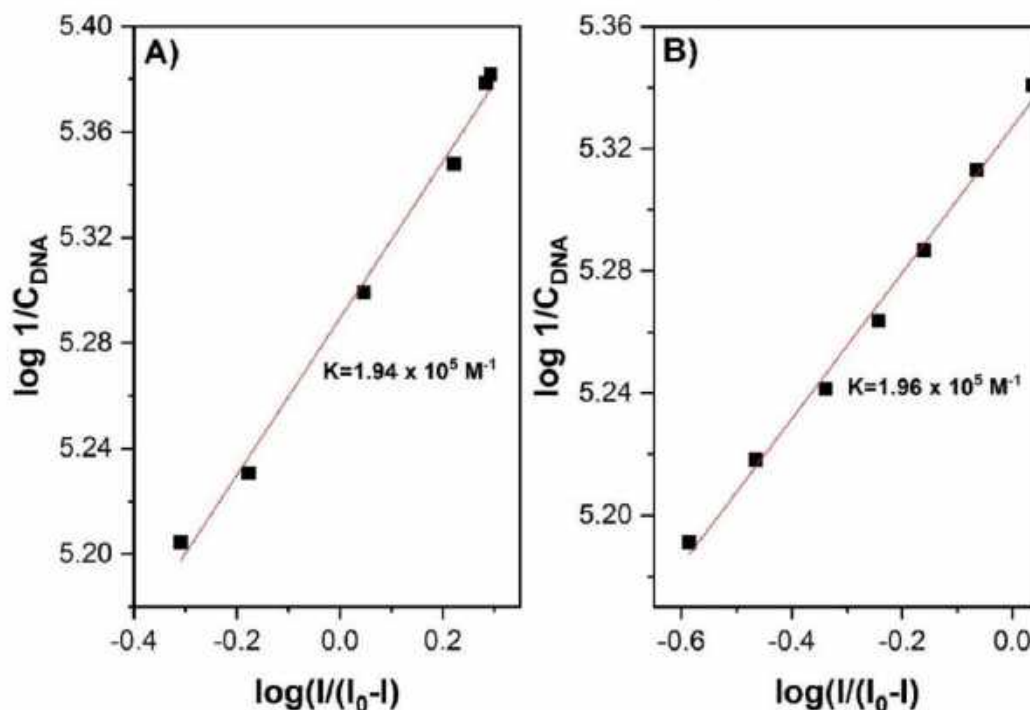
**Figure 2.** (A) Cyclic voltammogram of  $2 \times 10^{-4}$  M 1,5-ppz-AQ in an aqueous buffer at pH 7.4 in the absence (dashed line) and the presence (solid line) of 10–100  $\mu\text{M}$  ct-DNA on the glassy carbon electrode. Scan rate:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , temperature:  $25^\circ\text{C}$ ; (B) Cyclic voltammogram of  $2 \times 10^{-4}$  M ethidium bromide in aqueous buffer at pH 7.4 in the absence (dashed line) and the presence (solid line) of 10–100  $\mu\text{M}$  ctDNA on the glassy carbon electrode. Scan rate:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , temperature:  $25^\circ\text{C}$ . Figure adapted from the reference [24] with permission from Elsevier.

The value of the binding constant is not the only factor used to assess the type of interactions. In addition, the direction of the signal shift on the voltammogram, with an increase in the DNA concentration, indicates the nature of the interactions [91]. In general, the positive shift (a shift toward higher potential values) is caused by the intercalation with DNA [92], while the negative shift is observed for the electrostatic interaction of a drug with DNA [93]. Based on these trends, for example, the interactions of valrubicin with the DNA chain were determined [94]. Upon the successive addition of DNA to the valrubicin solution, the redox peak currents decreased and shifted to positive values due to the formation of a DNA–valrubicin adduct with a smaller diffusion coefficient. Therefore, the anodic shift in the voltammetric characteristic of valrubicin and the decrease in the peak currents with the addition of DNA were attributed to the intercalation mechanism.

Bayraktepe [54] used CV to study the interaction of DNA with dasatinib (DSB), an anti-cancer drug, for chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia treatment. She registered CV voltammograms of DSB in an acetate buffer solution (pH 4.8) using a pencil graphite electrode. A DSB anodic peak occurred at the  $+0.90 \text{ V}$  potential and it corresponded to the two-electron oxidation of the sulfur group of the thiazole ring to sulphonyl. The logarithm of the peak current vs. the logarithm of the scan rate plot had a linear character ( $R^2 = 0.9923$ ) which indicated that this redox process was controlled by adsorption under diffusion conditions. The DSB peak intensity decreased and shifted toward positive potential values in the presence of dsDNA. The calculated values of the



diffusion coefficients were  $8.40 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  and  $4.59 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  for the free DSB and the DSB–DNA adduct, respectively, which indicated the drug–DNA binding. Moreover, the heterogeneous electron transfer rate constants ( $k_s$ ) and the electrode surface concentration for the DSB and the DSB–DNA complex were calculated.



**Figure 3.** (A) The plot of  $\log [1-(I_0/I)]$  versus  $\log [1/DNA]$  used to calculate the binding constant of 1,5-ppz-AQ-ctDNA complex; (B) The plot of  $\log [1-(I_0/I)]$  versus  $\log [1/DNA]$  used to calculate the binding constant of the ethidium bromide–ctDNA complex. Figure adapted from the reference [24] with permission from Elsevier.

In addition, the interaction of metal–ligand complexes with the DNA chain was also studied using the electrochemical methods. Jabben et al. [82] analyzed three flavonoids (FIs), namely morin (mor), quercetin (quer), and primuletin (prim), as well as their complexes (with Cu (II) and Fe (III)) and investigated their DNA-binding ability. All the complexes were designed and tested for anticancer potential relative to flavonoid ligands. The values of the binding constant ( $K$ ) and the DNA binding modes were determined through spectroscopic methods and CV. The results of the conducted experiments showed that the complex compounds exhibited different binding modes compared to the corresponding flavonoids. These differences, in turn, strongly influenced the apoptotic activity of flavonoids as well as their metal complexes. It was found that Fe–mor, Cu–quer, prim, and Fe–quer were bound to dsDNA through the electrostatic mode of binding, while Cu–mor, mor, Cu–prim, and Fe–prim intercalated into it, whereas quercetin was shown to interact with the DNA groove.

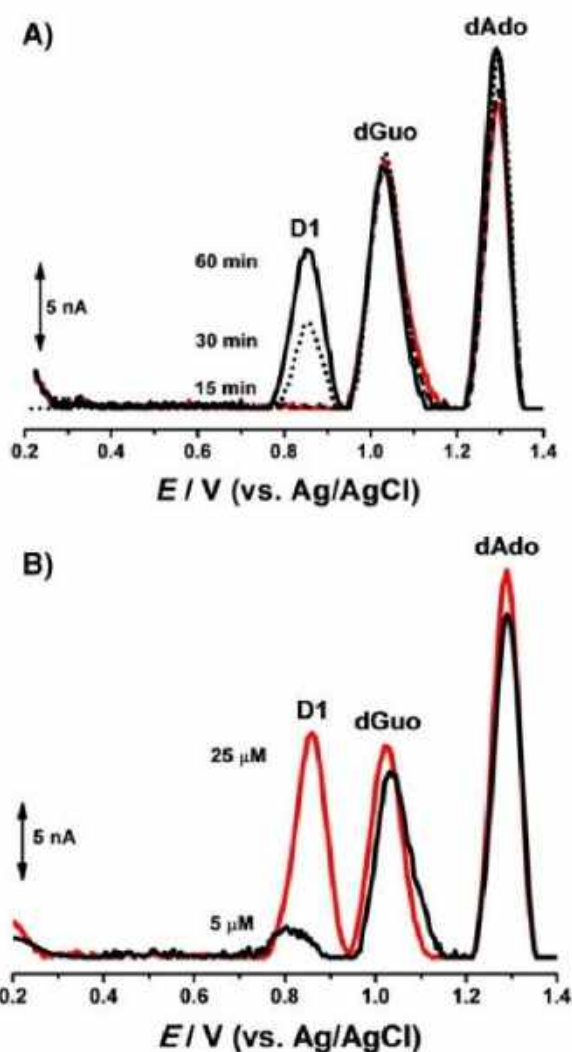
### 3.2. Differential Pulse Voltammetry (DPV)

In voltammetric techniques, the measured electrochemical signal is an algebraic sum of the undesirable capacitive current and the desired current related to the proper electrode reaction, the so-called Faraday current. DPV is an electrochemical technique which is widely used in chemical analysis and for studying the interactions of pharmaceuticals with DNA [41,43,45,51,60,63,65,94,95]. Its high sensitivity results from the pulsating change of potential applied to the working electrode. This type of signal modification effectively eliminates the capacitive current, thus facilitating the analysis of substances in a lower concentration range compared to the CV technique. The shape of the voltammetric curve is determined by a series of potential pulses applied at the right time to the working electrode. Following each pulse, the potential value returns to a slightly more negative value in the cathode part and to a more positive value in the anode part compared to that before the pulse. The pulse techniques work on the principle that with the step-change in potential, the values of both the currents increase sharply, while decreasing at different speeds. The capacitive current decreases rapidly compared to the Faraday current [84].

Buoro et al. used DPV for the electrochemical study of the interaction between gemcitabine (GEM) and DNA [43]. No GEM-associated redox process was observed under the experimental conditions. Two different approaches were used for studying the interactions: an unmodified GCE and a DNA electrochemical biosensor, prepared by successively covering the GCE surface with drops of the dsDNA solution. The DP voltammogram recorded immediately after the addition of GEM to the dsDNA solution displayed a decrease in the oxidation peak currents of dGuo and dAdo, compared with the control dsDNA solution. This effect was enhanced with an increase in the duration of the incubation of the sample and occurred under both experimental conditions (unmodified electrode and DNA electrochemical biosensor). The changes resulted from the aggregation of dsDNA, caused by the interaction with GEM, and were consistent with the spectrophotometric measurements. The formation of rigid DNA–GEM structures hindered the nucleoside residues from interacting and oxidizing at the GCE surface. The authors reported that the interaction between DNA and GEM caused modifications in the morphological structure of DNA. The mechanism of the DNA–GEM interaction occurred in two successive stages. The first stage was independent of the DNA sequence and led to the aggregation of dsDNA and the formation of the GEM–DNA rigid structure. The second stage favored the interaction between guanine hydrogen atoms in the CG base pair and fluorine atoms on the GEM ribose moiety, which induced the release of guanine residues on the electrode surface.

A similar approach was used by Diculescu et al. [45] in an experiment for analyzing the interaction between the anticancer drug danusertib and DNA. The studied drug was itself electrochemically active, which enabled the tracking of its individual signal changes. In addition, the experiment was carried out in incubated solutions, and DP voltammograms were recorded after different incubation periods. The voltammograms recorded after adding danusertib to the dsDNA solution displayed two oxidation peaks (D1 and D2) that were characteristic of the drug at lower potential values compared to the subsequent oxidation peaks of dGuo and dAdo. With a prolonged incubation period, a decrease in the peak current of the D2 signal was observed, while the intensity of peak D1 remained unchanged. An increase was observed in the intensity of the deoxyribonucleosides signals, which was in agreement with the conformational modification of the dsDNA. The second approach to the experiment involved the use of a prepared DNA electrochemical biosensor which had dsDNA immobilized on the GCE surface. The recorded voltammograms demonstrated the formation of a DNA–danusertib adduct (Figure 4A). The effect of drug concentration was also studied (Figure 4B). The binding of danusertib led to modifications in the morphological conformation of dsDNA, causing slight changes in the oxidation peak currents of dGuo and dAdo.

The studies determined the interaction of dsDNA–danusertib that occurred in two successive stages. The first stage involved the electrostatic interaction of the positively charged piperazine ring with the DNA phosphate backbone. In the second step, the formation of a DNA–drug complex involving the pyranopyrazole moiety occurred, resulting in morphological modifications in the DNA double helix.



**Figure 4.** DP voltammograms, with no conditioning potential, in a 0.1 M acetate buffer with a pH of 4.5, with the dsDNA-electrochemical biosensor after: (A) (—) 30 min in the buffer control experiment, and incubation in: 10  $\mu\text{M}$  of danusertib during (•••) 15, (---) 30 and (—) 60 min, and (B) incubation in (—) 5  $\mu\text{M}$  and (—) 25  $\mu\text{M}$  of danusertib during 30 min. Figure adapted from the reference [45] with permission from Elsevier.

The changes in the current signals recorded using the DPV technique can also be used to calculate the value of the drug–DNA binding constant. Dindar et al. [47] studied Citalopram (CIT) and its S-enantiomer—escitalopram (ESC), which are antidepressants belonging to the selective serotonin reuptake inhibitors class. The experiment was conducted by adding increasing concentrations of drugs (from 2 to 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to the 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ctDNA in an acetate buffer solution with a pH of 4.7 and recording the oxidation signals of dGuo and dAdo using GCE. Based on the reduction in the intensity of the current response ( $I$ ) caused by the binding of DNA to the CIT and ESC molecules, the plots of  $\log \left[ \frac{I_{\text{complex}}}{I_{\text{DNA}} - I_{\text{complex}}} \right]$  vs.  $\log C_{\text{drug}}$  were determined. Based on the slope and the intercept of the plot values, the binding constants for CIT and ESC were calculated ( $K_{\text{CIT-DNA}} = 5.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  and  $K_{\text{ESC-DNA}} = 8.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ), using the following equation:

$$\left[ \frac{I_{\text{complex}}}{I_{\text{DNA}} - I_{\text{complex}}} \right] = -\text{nlog}K - \text{nlog}C_{\text{drug}} \quad (5)$$

where  $I_{\text{DNA}}$  and  $I_{\text{complex}}$  are dAdo are the peak currents in the absence and presence of different drug concentrations, respectively. Slightly lower values of the binding constants compared to typical intercalators suggest a groove or an electrostatic binding mode rather than an interaction; however, it did not exclude it.

Bayraktepe [54] used DPV to describe the interaction of DNA with dasatinib (DSB) and to determine the adduct binding constant value. In her experiment, a 10.0  $\mu\text{M}$  DSB solution and an acetate buffer solution with a pH of 4.8 was used, and dsDNA was added (from 2 to 70  $\mu\text{M}$ ). DPV voltammograms showed that the peak current of DSB decreased with increasing DNA concentrations up to 30.0  $\mu\text{M}$  and then remained constant (Figure 5). Moreover, the peak potential of DPV voltammograms changed to more positive values. The binding constant of the DSB–DNA complex was calculated as  $K = 2.51 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Moreover, the Gibbs free energy ( $\Delta G^\circ$ ) of the adduct was estimated as  $-25.10 \text{ kJ/mol}$ , using the following equation:

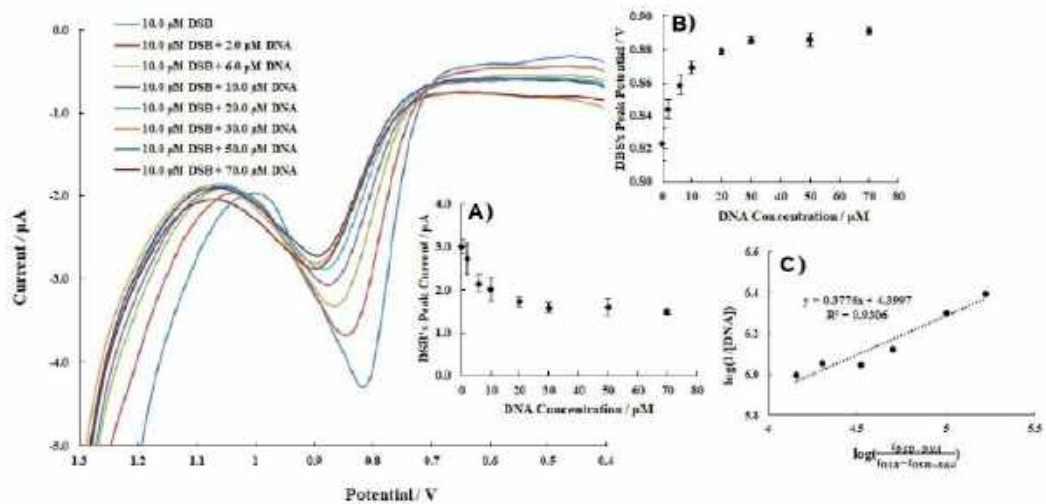
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (6)$$

The negative value proves the DSB and DNA interaction and indicates that binding occurred spontaneously. All the obtained results indicate that DSB interactions with DNA may have an intercalation mode. Thermodynamic parameters found from voltammetric measurements are comparable to those obtained by the UV spectroscopic method.

Ponkarpagam et al. [49] studied the interactions between ctDNA and rosiglitazone (RG)—a thiazolidinedione anti-diabetic drug—in a 0.05 M Tris-HCl buffer solution (pH 7.3) in the absence and presence of increasing concentrations of ctDNA, using GCE. The decrease in the peak current suggested an interaction of RG with ctDNA by the forming of an electrochemically non-active adduct. This is due to the low diffusion coefficient resulting from the Stokes–Einstein equation and, consequently, from low or negligible currents. The shift of the peak to a more negative potential indicated the groove binding mode of the interaction, which was also confirmed by molecular docking. The binding constant has been determined as  $K = 3.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .

Due to their ease of use, the construction of disposable measurement systems is an interesting trend in electrochemical approaches. In particular, modified surface electrodes are designed to improve the sensitivity or selectivity of measurements. Single-use modified biosensors are sensitive, time-saving, and practical tools for detecting the analyte. Such systems have several main advantages: a large surface area, effective mass transport, controllability, and their ability to study interactions in solution. Eksin et al. [51] studied the interaction between daunorubicin (DNR) and ctDNA at the surface of disposable carbon quantum dot-modified PGEs (cQD-PGE). For monitoring the surface-confined interaction, ctDNA was first immobilized onto the electrode surface, and then the electrochemical detection of the interaction between DNA and DNR was carried out. The study aimed to optimize the experimental conditions, such as the concentrations of both

ctDNA and DNR, as well as determine the effect of interaction time (from 3 to 15 min) on the changes in the oxidation signals of guanine and DNR. Under optimal conditions, very low values of the detection limits were obtained for DNR and ctDNA—0.02 µg/mL and 0.89 µg/mL, respectively.

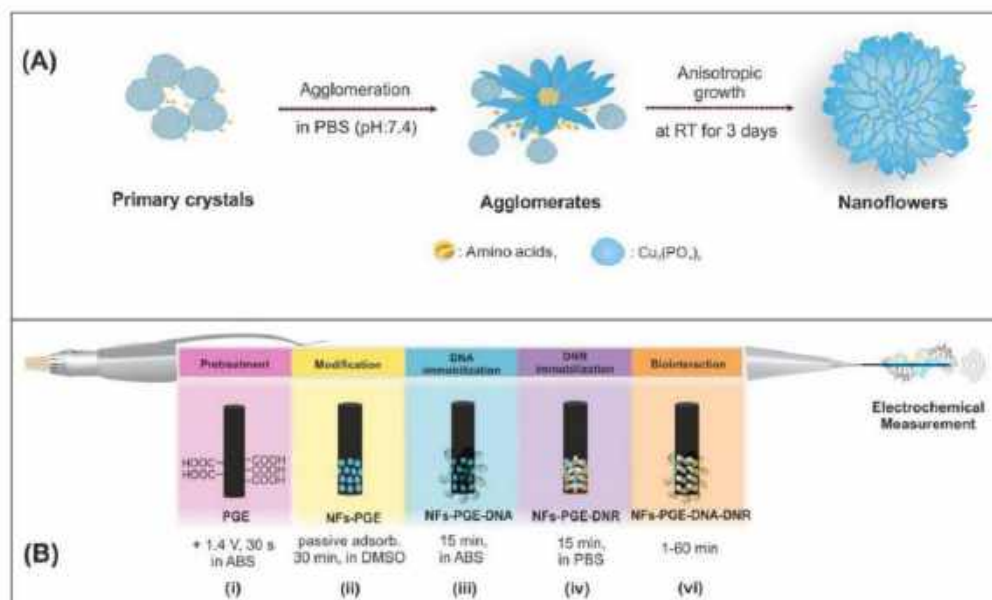


**Figure 5.** DPV voltammograms of 10.0 µM DSB with increasing concentrations of DNA in an acetate buffer solution with a pH of 4.8. Insets: (A)  $C_{DNA} - I_{p,DSB}$ ; (B)  $C_{DNA} - E_{p,DSB}$ ; (C)  $\log \frac{I_{ox-DNA}}{I_{red-DNA}} - \log \left( \frac{1}{[DNA]} \right)$ . Figure adapted from the reference [54] with permission from Elsevier.

Other examples of interesting modifications were presented by Findik et al., who have modified pencil graphite electrodes (NFs-PGE; Figure 6) as sensitive electrochemical biosensors for the anticancer drugs daunorubicin (DNR) [53] and mitomycin C (MC) [52]. In these studies, newly designed and different organic–inorganic hybrid nanoflowers were used.

In the case of the development of disposable voltammetric sensors for the electrochemical analysis of ctDNA, DNR, and the interaction between them, the L-glutamic acid nanoflowers (ga-NFs) and L-cysteine nanoflowers (c-NFs) were applied. Amino acid- $Cu_3(PO_4)_2$  hybrid NFs were modified at the surface of single use PGE. The c-NFs-PGE electrode turned out to be very sensitive for the detection of both DNA (0.93 µg/mL) and DNR (2.93 µM). In the case of the DNR–DNA interaction, which was the main purpose of Findik's study, it was determined that both the DNR oxidation peak and the guanine peak decreased at all interaction times. The highest decrease in a short time of 1 min showed that c-NFs-PGE is a very useful sensor for DNR studies.

The sensors developed to determine MC and its interactions with DNA used glycine and lysine nanoflowers, and were labeled as GNFs and LNfS, respectively. Nanoflowers formed the mono-dispersed 3D hierarchical superstructures (Figure 7). The average diameter of these hybrid NFs with excellent monodispersity was determined to be 3 µm and they were obtained in a homogeneous structure.



**Figure 6.** (A) Schematic illustration of the formation of a amino acids- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  hybrid NFs, (B) The representative scheme of the pretreatment of PGE (i), modification of NFs (ii), immobilization of DNA (iii) and DNR (iv), surface-confined interaction of DNR and ctDNA (vi). Figure adapted from the reference [53] with permission from Elsevier.

The detection limit of the biosensor was determined ( $1.09 \mu\text{g}/\text{mL}$  for ctDNA) and the biointeraction between MC and ctDNA was investigated.

In order to develop a sensitive tool for DNA detection and to elucidate its structural changes after the interaction with drugs, Bolat [55] constructed a DNA biosensor based on electrodeposited cetyl trimethylammonium bromide-multiwalled carbon nanotubes (poly(CTAB-MWCNTs)) composite on single-use PGE. The DPV and UV-Vis techniques were used to study the interaction of dsDNA with the anticancer drug irinotecan (CPT-11). Voltammetric measurements were based on the changes at the guanine oxidation peak. A high sensitivity was obtained for DNA and DNA-anticancer drug interaction with detection limits of  $3.06 \mu\text{g}/\text{mL}$  and  $1.03 \mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. Moreover, the binding constant value was determined as  $K = 6.84 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . The experiment showed that the interaction between CPT-11 and DNA leads to a condensation of the DNA double helix and indicated a groove binding mechanism.

Janiszek et al. [48] in their experiment compared two prospective anticancer drugs, 6-(1*H*-imidazo [4,5-*b*]phenazine-2-yl)benzene-1,3-diol (IPBD) and its -Cl derivative (Cl-IPBD) with doxorubicin, a widely used anthracycline anticancer agent. For the comparison of the DNA interactions with the drugs, plasmid modified GCEs were used. The aim of the modification of the electrode with supercoiled plasmid instead of typically chromosomal DNA was to minimize the interference of the DNA oxidation. Plasmid (scpUC19) accumulation resulted in the formation of well defined, reproducible plasmid DNA layers on a typical, easily available GCE. In this experiment DPV, square wave voltammetry (SWV) and the less frequently used alternating current voltammetry (ACV) with phase detection  $0^\circ$ , ACV ( $0^\circ$ ), as well as  $90^\circ$ , ACV ( $90^\circ$ ) techniques were used in a specific combination. The correlation of the redox signals of IPBD and Cl-IPBD, with their biological effect on cancer cells were shown. Moreover, the effect of Vitamin C on the redox signals of Cl-IPBD that resemble the reduction in Pt(IV) anticancer prodrugs to Pt(II) compounds was observed.

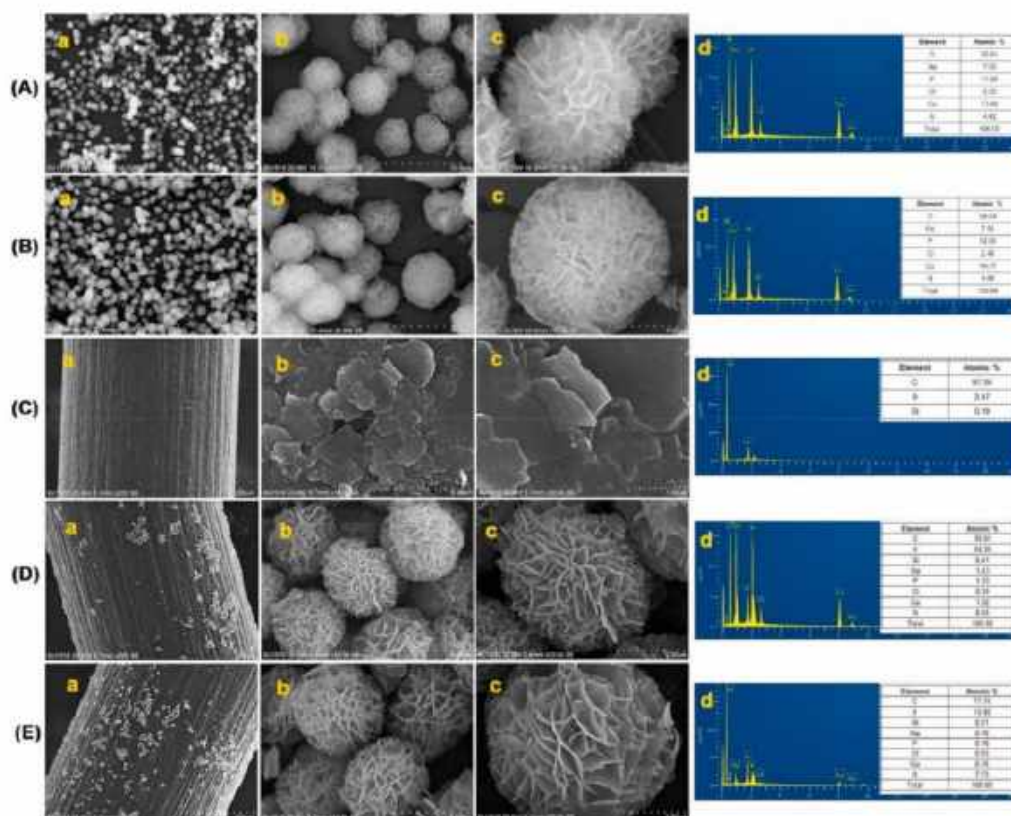
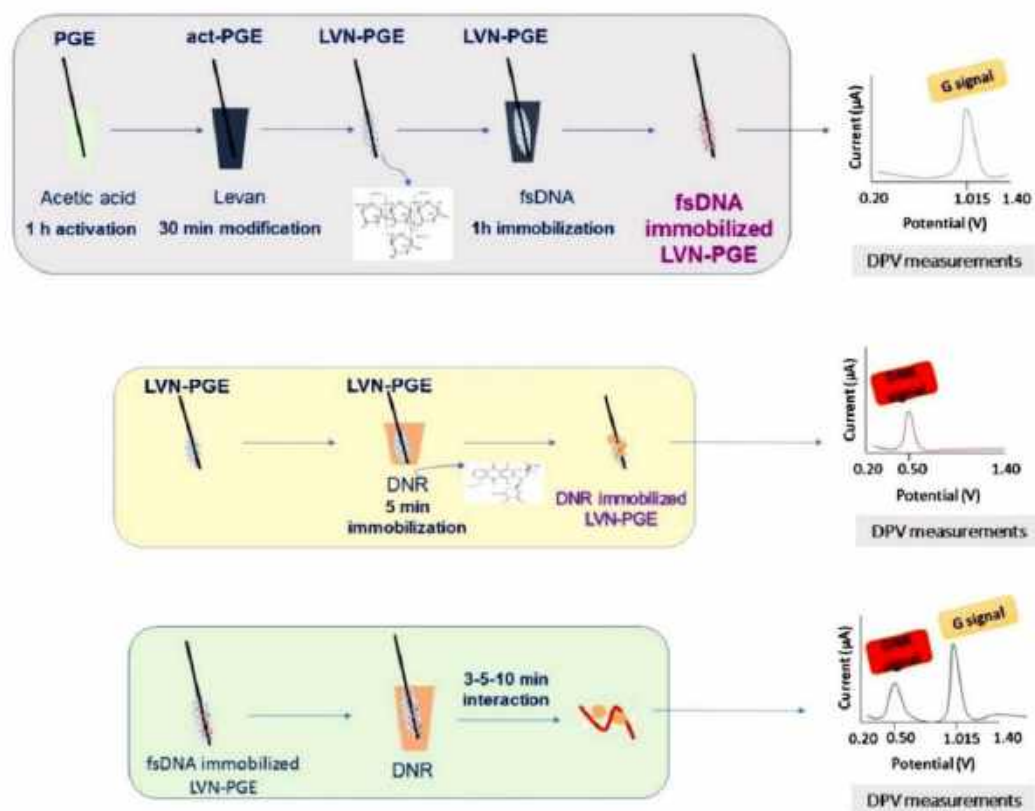


Figure 7. SEM image of (A) GNFs; (B) LNFs; (C) PGE; (D) GNFs-PGE; (E) LNFs-PGE ((a–c)—different resolutions) and EDX pattern (d). Figure adapted from the reference [52] with permission from Elsevier.

Moreover, biopolymers are used for electrode modification as they offer stable, biocompatible, and large surface areas for the immobilization of biomolecules. Congur et al. [56] modified PGEs with Levan (LVN), a fructan homopolysaccharide comprised of  $\beta$ -D-fructofuranose residues linked by  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6) glycosidic bonds (Figure 8). The aim of the experiment was to develop disposable electrochemical biosensors for the detection of DNA, daunorubicin (DNR), and the biomolecular interaction of DNR with DNA. The interaction of 20  $\mu$ M DNR with DNA at the DNA-LVN-PGE modified electrode was evaluated between 3 and 10 min and a decrease in guanine and DNR signals (increasing with the interaction time) was observed. This was caused due to the intercalation of DNR into double stranded DNA resulting in strand breaks.

Javar et al. [58] developed an electrochemical DNA biosensor based on modified CPEs ( $\text{Eu}^{3+}$ -doped NiO/CPEs) for the determination of the anti-cancer drug amsacrine. The powder XRD technique was used to examine the crystal structure of the synthesized nanocomposite and cyclic voltammograms of  $\text{Fe}[\text{CN}]_6^{3-/4-}$  redox couple were recorded at the surface of the bare CPE, NiO NPs/CPE,  $\text{Eu}^{3+}$ -doped NiO/CPE, and dsDNA/ $\text{Eu}^{3+}$ -doped NiO/CPE were used as the indicators for modification. The effect of the amsacrine-guanine interaction has been electrochemically investigated in comparison to the alterations in the guanine oxidation peak in the absence and presence of amsacrine.



**Figure 8.** The experimental steps of the modification of LVN at the PGE surface, voltammetric determination of fsDNA and DNR using LVN-PGE and the voltammetric analysis of the biomolecular interaction between fsDNA and DNR at the LVN-PGE surface. Figure adapted from the reference [56] with permission from Elsevier.

The DPV technique can also be used to study the interaction between metal–ligand complexes and the DNA chain. In the experiment carried out by Kumar et al. [60], the results of voltammetric and spectroscopic studies confirmed that tetraazamacrocyclic complexes interacted with DNA through the same type of binding. Voltammograms obtained for each macrocyclic complex displayed a significant decrease in the current intensity in the presence of ctDNA, which indicates that these metal ions stabilize the ctDNA duplex by the intercalation mode. It was found that the macrocyclic cobalt (II) ion complex interacts most strongly with ctDNA.



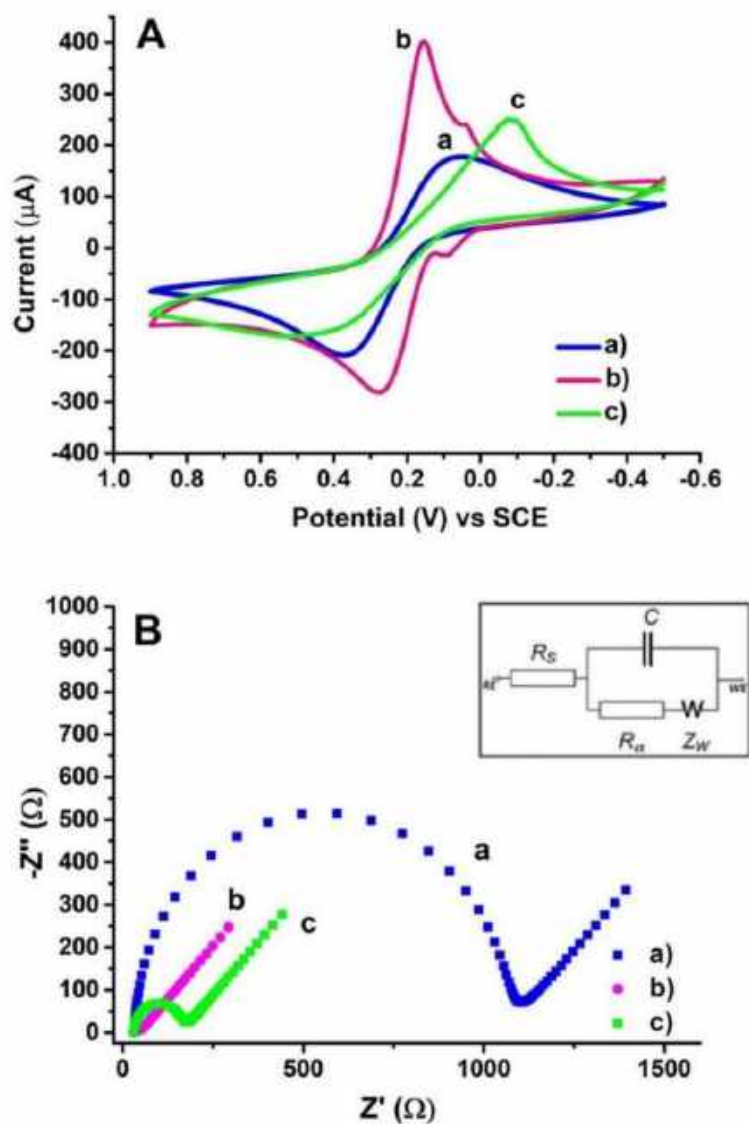
### 3.3. Other Methods

Other electrochemical methods, including square wave voltammetry (SWV) [59] and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) [51,90], are also used to monitor the binding of molecules to the DNA chain. The first one is a type of linear potential sweep voltammetry involving a combined square wave and a staircase potential applied to a stationary electrode. Using SWV, Temerk and Ibrahim [59] determined the effect of a constant dsDNA concentration on the electrochemical response of a series of flutamide (Flu) solutions with varying concentrations. The plot displayed a slope representing the dependence between  $\log [\Delta I / (\Delta I_{max} - \Delta I)]$  and  $\log [\text{Flu}]$ , which confirmed the formation of a complex with 1:1 stoichiometry. In addition, the molar relation of flutamide interacting with a molar quantity of dsDNA bases and the binding constant for the dsDNA–Flu adduct were determined.

EIS involves the measurement of the impedance between the working electrode and the auxiliary electrode, and is used, for example, to assess the structure of a modified electrode surface. Bolat [55] recorded the Nyquist diagrams of the impedance spectra during poly(CTAB-MWCNTs) modification of PGE (Figure 9B). The unmodified PGE electron charge transfer resistance (Rct) value was estimated as 1131.5  $\Omega$  and decreased to 15.7  $\Omega$  for poly(CTAB-MWCNTs)/PGE confirming the good electrical conductivity of the produced film. This demonstrated the stronger electron transfer ability of the redox ions to the electrode surface. At the next modification step—dsDNA immobilization, an increase in the Rct value was observed (132.2  $\Omega$ ). This indicates a reduced ability for electron transfer at the electrode surface due to the non-conductive dsDNA layer. In addition, the subsequent modification steps were also controlled using the CV technique (Figure 9A). The registered changes in the CV voltammograms and the Nyquist diagrams of the studied electrode illustrate and confirm the ongoing modification increasing the sensitivity of PGE.

Eksin et al. [51] used EIS to investigate the surface-confined interaction of DNR with ctDNA. Nyquist diagrams were recorded before and after the interaction process at different intervals. In the Tajik et al. [90] experiment, taxol interacted with guanine and adenine at the surface of the dsDNA-modified PGE. The electrochemical characterization of bare PGE, dsDNA/PGE, and taxol–dsDNA/PGE was made with EIS to illustrate the changes caused by the intercalation-mode binding of taxol to DNA on the electrode surface. The conducted research led to the design and development of a novel taxol biosensor. Moreover, Findik et al. [52,53] used this method to characterize the surface and evaluate the effectiveness of PGE electrode modification with newly designed hybrid nanoflowers.

A new, unique, and innovative method for studying the interaction of macromolecules is based on a dynamic electrical switching of the DNA layers on a metal electrode surface during solution flow. This technique applies regenerable chips adapted to functionalization. Electrically switchable nanolever technology (switchSENSE) has been used successfully in research, e.g., the binding and dissociation kinetics parameters of molecules such as proteins or polyamides to nucleic acids [96–99]. The interactions of small molecules with proteins attached to DNA fragments (on the electrode surface) are also being studied using this technique [100]. In our laboratory, we have recently started working on adapting this technique to study the mechanism of binding small drug molecules and their complexes directly to the DNA chain. Initial research results are promising, and the technique has the potential to become another powerful electrochemical-based tool for studying the affinity of pharmaceuticals to biomolecules.



**Figure 9.** Electrochemical characterization of the surface layer assembly. (A) CVs at a scan rate of  $100 \text{ mVs}^{-1}$  and (B) The Nyquist diagrams of impedance recorded on (a) bare PGE, (b) PGE coated with poly(CTAB-MWCNTs), (c)  $150 \mu\text{g/mL}$  dsDNA immobilized poly(CTAB-MWCNTs)/PGE in  $0.1 \text{ M}$  KCl solution containing  $5.0 \text{ mM Fe(CN)}_6^{3-/4-}$  (Inset represents the equivalent circuit model for fitted impedance data.  $R_s$  is the solution resistance;  $R_{ct}$  is the charge transfer resistance at the electrode/electrolyte interface;  $C$  is the constant phase element related to the space charge capacitance at the electrode/electrolyte interface;  $W$  is the Warburg element). Figure adapted from the reference [55] with permission from Elsevier.

#### 4. Conclusions

Research results compiled in this review show that electrochemical methods are a powerful tool in DNA–drug interaction studies. The essential parameters of the experiments are summarized in Table 1. The data presented there illustrate the research directions and possibilities offered by voltammetric techniques.

The selection of the appropriate voltammetric technique and electrode material, the properties of the studied drug, and the specificity of the experiment performed present an opportunity to obtain a distinct set of information on the type and strength of the interaction. This summary demonstrates that CV and DPV techniques are the most frequently used for DNA–drug interaction studies. These methods allow the experiment in selected environmental conditions (buffer type and pH) to be conducted and important parameters such as: limits of drug detection, values of diffusion coefficients, and binding constants to be defined. The thermodynamic parameters including Gibbs free energy and enthalpy changes can be calculated as well [54]. The most common working electrodes used in the study of DNA–drug interactions are often made of carbon materials (GCEs and PGEs). In order to increase the sensitivity of the measurements, various modifications of the electrode surface are made. The most common way is the immobilization of DNA fragments, usually in a double-stranded form (dsDNA), on the working surface [45,90]. The compiled data show that due to their properties and disposability, PGEs are most willingly modified. The introduction of polymeric systems on the electrode surface is just one example of such modifications [56]. Because of the unique chemical and electronic properties of nanomaterials, the detection of biological compounds on nanomaterial-modified electrodes has received especially great attention [51–53,55]. Their usefulness is related to their large surface area, high conductivity, and their ability to promote electron transfer rate and stability. The modification of working electrodes extends the preparation time but can significantly increase their usability. In the case of the cQD-PGEs experiment [51], lower LODs values were obtained than in earlier reports related to daurorubicin detection. All the presented experiments were conducted in the pH range from 4.5 to 7.4, which is also suitable for *in vivo* studies as it is compatible with intracellular conditions. To control the course of modification and to analyze the surface of the modified electrode, EIS and SVW techniques measurements are preferred. Most of the conducted studies concern anticancer drugs.

Understanding the mechanism of DNA–drug interactions is crucial in biological studies on drug design and pharmaceutical development processes. The use of voltammetric techniques is extremely useful for this purpose. They provide the ability to study the interactions of potential drugs with DNA in a comprehensive manner. Electrochemical biosensors are both sensitive and convenient in application. They can be used for many different pharmaceuticals, especially if they contain an electrochemically active moiety. Voltammetric methods are very important as both primary and complementary analysis tools in *in vivo* studies, aiding in the exploration of the nature of DNA–drug bonding. Due to their usefulness, they are expected to become even more popular in the future. New adjustments to biosensors will most likely include modifications to biosensors and the creation of regenerable chips that can be adapted to any desired functionalization.

**Author Contributions:** The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Polish National Science Centre under Grant [UMO-2019/33/B/ST4/00031].

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Hasanzadeh, M.; Shadjou, N. Pharmacogenomic Study Using Bio- and Nanobioelectrochemistry: Drug–DNA Interaction. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *61*, 1002–1017. [CrossRef]
2. Sirajuddin, M.; Ali, S.; Badshah, A. Drug–DNA Interactions and Their Study by UV–Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2013**, *124*, 1–19. [CrossRef]
3. Rehman, S.U.; Sarwar, T.; Husain, M.A.; Ishqi, H.M.; Tabish, M. Studying Non-Covalent Drug–DNA Interactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *576*, 49–60. [CrossRef]
4. Nafie, G.; Marzilli, L.G. Non-Covalent Interactions in Adducts of Platinum Drugs with Nucleobases in Nucleotides and DNA as Revealed by Using Chiral Substrates. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 1315–1331. [CrossRef]
5. Devi, J.; Pachwaria, S. Recent Advancements in DNA Interaction Studies of Organotin(IV) Complexes. *Inorg. Chem. Commun.* **2018**, *91*, 44–62. [CrossRef]
6. Foteeva, L.S.; Matczuk, M.; Timerbaev, A.R. Analytical Methodology for Determination of Interactions between Metallodrugs and DNA: A Critical Examination. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2017**, *90*, 107–113. [CrossRef]
7. Brabec, V.; Kasparkova, J. Ruthenium Coordination Compounds of Biological and Biomedical Significance. DNA Binding Agents. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *376*, 75–94. [CrossRef]
8. Li, X.-L.; Hu, Y.-J.; Wang, H.; Yu, B.-Q.; Yue, H.-L. Molecular Spectroscopy Evidence of Berberine Binding to DNA: Comparative Binding and Thermodynamic Profile of Intercalation. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 873–880. [CrossRef] [PubMed]
9. Sasikala, W.D.; Mukherjee, A. Molecular Mechanism of Direct Proflavine–DNA Intercalation: Evidence for Drug-Induced Minimum Base-Stacking Penalty Pathway. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 12208–12212. [CrossRef] [PubMed]
10. Jangir, D.K.; Dey, S.K.; Kundu, S.; Mehrotra, R. Assessment of Amsacrine Binding with DNA Using UV–Visible, Circular Dichroism and Raman Spectroscopic Techniques. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2012**, *114*, 38–43. [CrossRef]
11. Antonini, I.; Polucci, P.; Magrano, A.; Gatto, B.; Palumbo, M.; Menta, E.; Pescalli, N.; Martelli, S. Design, Synthesis, and Biological Properties of New Bis(Acridine-4-Carboxamides) as Anticancer Agents. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3109–3115. [CrossRef]
12. Fairbanks, S.D.; Robertson, C.C.; Keene, E.R.; Thomas, J.A.; Williamson, M.P. Structural Investigation into the Threading Intercalation of a Chiral Dinuclear Ruthenium(II) Polypyridyl Complex through a B-DNA Oligonucleotide. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 4644–4652. [CrossRef] [PubMed]
13. Shakeel, M.; Butt, T.M.; Zubair, M.; Siddiqi, H.M.; Janjua, N.K.; Akhter, Z.; Yaqub, A.; Mahmood, S. Electrochemical Investigations of DNA-Intercalation Potency of Bisnitrophenoxy Compounds with Different Alkyl Chain Lengths. *Helvion* **2020**, *6*, e04124. [CrossRef] [PubMed]
14. Sissi, C.; Dovigo, L.; Greco, M.L.; Ciancetta, A.; Moro, S.; Trzciński, J.W.; Marcin, F.; Rossi, P.; Spalluto, G.; Tecilla, P. Conjugates between Minor Groove Binders and Zn(II)-Tach Complexes: Synthesis, Characterization, and Interaction with Plasmid DNA. *Tetrahedron* **2017**, *73*, 3014–3024. [CrossRef]
15. Zhou, X.; Zhang, G.; Pan, J. Groove Binding Interaction between Daphnetin and Calf Thymus DNA. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *74*, 185–194. [CrossRef] [PubMed]
16. Bendic, C.; Enache, M.; Volanschi, E. Analysis of Actinomycin D–DNA Model Complexes Using a Quantum-Chemical Criterion: Mulliken Overlap Populations. *J. Mol. Graph. Model.* **2005**, *24*, 10–16. [CrossRef] [PubMed]
17. Searle, M.S. NMR Studies of Drug–DNA Interactions. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1993**, *25*, 403–480. [CrossRef]
18. Powers, R. Applications of NMR to Structure-Based Drug Design in Structural Genomics. *J. Struct. Funct. Genom.* **2002**, *2*, 113–123. [CrossRef]
19. Ahmadi, F.; Jafari, B.; Rahimi-Nasrabadi, M.; Ghasemi, S.; Ghanbari, K. Proposed Model for in Vitro Interaction between Fenitrothion and DNA, by Using Competitive Fluorescence, <sup>31</sup>P NMR, <sup>1</sup>H NMR, FT-IR, CD and Molecular Modeling. *Toxicol. Vitr.* **2013**, *27*, 641–650. [CrossRef]
20. Ahmadi, F.; Alizadeh, A.A.; Shahabadi, N.; Rahimi-Nasrabadi, M. Study Binding of Al–Curcumin Complex to Ds-DNA, Monitoring by Multispectroscopic and Voltammetric Techniques. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2011**, *79*, 1466–1474. [CrossRef]
21. Benevides, J.M.; Overman, S.A.; Thomas, G.J. Raman, Polarized Raman and Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy of Nucleic Acids and Their Complexes. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 279–299. [CrossRef]
22. Morjani, H.; Riou, J.-F.; Nabiev, I.; Lavelle, F.; Manfait, M. Molecular and Cellular Interactions between Intoplicine, DNA, and Topoisomerase II Studied by Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 4784–4790.
23. Jenkins, T.C. Optical Absorbance and Fluorescence Techniques for Measuring DNA–Drug Interactions. In *Drug–DNA Interaction Protocols*; Fox, K.R., Ed.; Methods in Molecular Biology<sup>TM</sup>; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 1997; pp. 195–218. ISBN 978-1-59259-574-7.
24. Białobrzaska, W.; Niedziałkowski, P.; Malinowska, N.; Cebula, Z.; Ossowski, T. Analysis of Interactions between Calf Thymus DNA and 1,5-Di(piperazin-1-yl)anthracene-9,10-Dione Using Spectroscopic and Electrochemical Methods. *J. Mol. Liq.* **2019**, *289*, 111080. [CrossRef]
25. Ataci, N.; Ozelik, E.; Arsu, N. Spectrophotometric Study on Binding of 2-Thioxanthone Acetic Acid with Ct-DNA. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *204*, 281–286. [CrossRef]
26. Chylewska, A.; Biedulska, M.; Makowski, M. Multi-Analytical Studies about Physico-Chemical Properties of Ni(II)-Vitamin B6 Coordination Compounds and Their CT-DNA Interactions. *J. Mol. Liq.* **2017**, *243*, 771–780. [CrossRef]

27. Jia, T.; Chen, Z.-H.; Guo, P.; Yu, J. An Insight into DNA Binding Properties of Newly Designed Cationic  $\delta,\delta'$ -diazacarbazoles: Spectroscopy, AFM Imaging and Living Cells Staining Studies. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, *211*, 260–271. [CrossRef]
28. Bhattacharjee, M.; Boruah, S.R.; Dutta Purkayastha, R.N.; Ganguly, R.; Maiti, D.; Franconetti, A.; Frontera, A.; Kirillov, A.M.; Chowdhury, S.; Roy, S.; et al. Synthesis, Characterization, DNA Binding Ability, in Vitro Cytotoxicity, Electrochemical Properties and Theoretical Studies of Copper(II) Carboxylate Complexes. *Inorg. Chim. Acta* **2021**, *518*, 120235. [CrossRef]
29. Sen, S.; Sett, R.; Paul, B.K.; Guchhait, N. A Spectroscopic Deciphering of the Differential Interaction Behavior of Alkaloid Drugs with Native B-DNA and Protonated DNA. *J. Mol. Liq.* **2020**, *312*, 113426. [CrossRef]
30. Tullio, A.D.; Reale, S.; Angelis, F.D. Molecular Recognition by Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 845–865. [CrossRef] [PubMed]
31. Gavina, J.M.A.; Yao, C.; Feng, Y.-L. Recent Developments in DNA Adduct Analysis by Mass Spectrometry: A Tool for Exposure Biomonitoring and Identification of Hazard for Environmental Pollutants. *Talanta* **2014**, *130*, 475–494. [CrossRef] [PubMed]
32. Rabbani-Chadegani, A.; Mollaei, H.; Sargotzaei, J. Investigation of the Interaction between Berberine and Nucleosomes in Solution: Spectroscopic and Equilibrium Dialysis Approach. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *173*, 418–424. [CrossRef]
33. Lin, L.-P.; Huang, L.-S.; Lin, C.-W.; Lee, C.-K.; Chen, J.-L.; Hsu, S.-M.; Lin, S. Determination of Binding Constant of DNA-Binding Drug to Target DNA by Surface Plasmon Resonance Biosensor Technology. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metab. Disord.* **2005**, *5*, 61–72. [CrossRef]
34. Zhou, C.; Zou, H.; Sun, C.; Ren, D.; Chen, J.; Li, Y. Signal Amplification Strategies for DNA-Based Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *117*, 678–689. [CrossRef] [PubMed]
35. Rauf, S.; Gooding, J.J.; Akhtar, K.; Ghauri, M.A.; Rahman, M.; Anwar, M.A.; Khalid, A.M. Electrochemical Approach of Anticancer Drugs–DNA Interaction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 205–217. [CrossRef] [PubMed]
36. Tamer, Ö.; Tamer, S.A.; Idil, Ö.; Avca, D.; Vural, H.; Atalay, Y. Antimicrobial Activities, DNA Interactions, Spectroscopic (FT-IR and UV-Vis) Characterizations, and DFT Calculations for Pyridine-2-Carboxylic Acid and Its Derivates. *J. Mol. Struct.* **2018**, *1152*, 399–408. [CrossRef]
37. Mukherjee, A.; Sasikala, W.D. Chapter One—Drug–DNA Intercalation: From Discovery to the Molecular Mechanism. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology; Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*; Karabencheva-Christova, T., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2013; Volume 92, pp. 1–62.
38. Drescher, D.C.; Drescher, M.J.; Ramakrishnan, N.A. Surface Plasmon Resonance (SPR) Analysis of Binding Interactions of Proteins in Inner-Ear Sensory Epithelia. In *Auditory and Vestibular Research: Methods and Protocols*; Sokolowski, B., Ed.; Methods in Molecular Biology<sup>TM</sup>; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2009; pp. 323–343. ISBN 978-1-59745-523-7.
39. Hirman, S.S.; McKeating, K.S.; Cheng, Q. Surface Plasmon Resonance: Material and Interface Design for Universal Accessibility. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 19–39. [CrossRef] [PubMed]
40. Stizen, S.; Demircigil, B.T.; Buyukbingol, E.; Özkan, S.A. Electroanalytical Evaluation and Determination of 5-(3'-Indolyl)-2-Thiohydantoin Derivatives by Voltammetric Studies: Possible Relevance to in Vitro Metabolism. *New J. Chem.* **2003**, *27*, 1007–1011. [CrossRef]
41. Satana, H.E.; Pontinha, A.D.R.; Diculescu, V.C.; Oliveira-Brett, A.M. Nucleoside Analogue Electrochemical Behaviour and in Situ Evaluation of DNA–Clofarabine Interaction. *Bioelectrochemistry* **2012**, *87*, 3–8. [CrossRef]
42. Palanimurugan, A.; Dhanalakshmi, A.; Selvapandian, P.; Kulandaisamy, A. Electrochemical Behavior, Structural, Morphological, Calf Thymus-DNA Interaction and in-Vitro Antimicrobial Studies of Synthesized Schiff Base Transition Metal Complexes. *Heliyon* **2019**, *5*, e02039. [CrossRef]
43. Buoro, R.M.; Lopes, I.C.; Diculescu, V.C.; Serrano, S.H.P.; Lemos, L.; Oliveira-Brett, A.M. In Situ Evaluation of Gemcitabine–DNA Interaction Using a DNA-Electrochemical Biosensor. *Bioelectrochemistry* **2014**, *99*, 40–45. [CrossRef]
44. Shabbir, M.; Ahmad, I.; Ismail, H.; Ahmed, S.; McKee, V.; Akhter, Z.; Mirza, B. Pharmacological, Electrochemical and Drug–DNA Interaction Aspects of Tridentate Schiff Bases and Their Triphenylphosphine Nickel(II) Complexes. *Polyhedron* **2017**, *133*, 270–278. [CrossRef]
45. Diculescu, V.C.; Oliveira-Brett, A.M. In Situ Electrochemical Evaluation of DsDNA Interaction with the Anticancer Drug Danusertib Nitrenium Radical Product Using the DNA-Electrochemical Biosensor. *Bioelectrochemistry* **2016**, *107*, 50–57. [CrossRef] [PubMed]
46. Zia, M.; Hameed, S.; Ahmad, I.; Tabassum, N.; Yousaf, S. Synthesis, Characterization, Electrochemical and DNA Binding Studies of Regio-Isomeric Sulfonyl Esters of Substituted Isoxazoles. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1202*, 127230. [CrossRef]
47. Dindar, Ç.K.; Erkmen, C.; Yıldırım, S.; Bozal-Palabiyik, B.; Uslu, B. Interaction of Citalopram and Escitalopram with Calf Thymus DNA: A Spectrofluorometric, Voltammetric, and Liquid Chromatographic Approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2021**, *195*, 113891. [CrossRef] [PubMed]
48. Janiszek, D.; Karpitska, M.M.; Niewiadomy, A.; Kośmider, A.; Girstun, A.; Elzanowska, H.; Kulesza, P.J. Differences in Electrochemical Response of Prospective Anticancer Drugs IPBD and Cl-IPBD, Doxorubicin and Vitamin C at Plasmid Modified Glassy Carbon. *Bioelectrochemistry* **2021**, *137*, 107682. [CrossRef] [PubMed]

49. Ponkarpagam, S.; Mahalakshmi, G.; Vennila, K.N.; Elango, K.P. Multi-Spectroscopic, Voltammetric and Molecular Docking Studies on Binding of Anti-Diabetic Drug Rosiglitazone with DNA. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *234*, 118268. [CrossRef] [PubMed]
50. Congur, G.; Eksin, E.; Erdem, A. Chitosan Modified Graphite Electrodes Developed for Electrochemical Monitoring of Interaction between Daunorubicin and DNA. *Sens. Bio-Sens. Res.* **2019**, *22*, 100255. [CrossRef]
51. Eksin, E.; Senturk, H.; Zor, E.; Bingol, H.; Erdem, A. Carbon Quantum Dot Modified Electrodes Developed for Electrochemical Monitoring of Daunorubicin-DNA Interaction. *J. Electroanal. Chem.* **2020**, *862*, 114011. [CrossRef]
52. Findik, M.; Bingol, H.; Erdem, A. Hybrid Nanoflowers Modified Pencil Graphite Electrodes Developed for Electrochemical Monitoring of Interaction between Mitomycin C and DNA. *Talanta* **2021**, *222*, 121647. [CrossRef] [PubMed]
53. Findik, M.; Bingol, H.; Erdem, A. Electrochemical Detection of Interaction between Daunorubicin and DNA by Hybrid Nanoflowers Modified Graphite Electrodes. *Sens. Actuators B Chem.* **2021**, *329*, 129120. [CrossRef]
54. Bayraktape, D.E. A Voltammetric Study on Drug-DNA Interactions: Kinetic and Thermodynamic Aspects of the Relations between the Anticancer Agent Dasatinib and Ds-DNA Using a Pencil Lead Graphite Electrode. *Microchem. J.* **2020**, *157*, 104946. [CrossRef]
55. Bolat, G. Investigation of Poly(CTAB-MWCNTs) Composite Based Electrochemical DNA Biosensor and Interaction Study with Anticancer Drug Irinotecan. *Microchem. J.* **2020**, *159*, 105426. [CrossRef]
56. Congur, G.; Eksin, E.; Erdem, A. Levam Modified DNA Biosensor for Voltammetric Detection of Daunorubicin-DNA Interaction. *Sens. Actuators B Chem.* **2021**, *326*, 128818. [CrossRef]
57. Bruzaca, E.E.S.; Lopes, I.C.; Silva, E.H.C.; Carvalho, P.A.V.; Tanaka, A.A. Electrochemical Oxidation of the Antitumor Antibiotic Mitomycin C and in Situ Evaluation of Its Interaction with DNA Using a DNA-Electrochemical Biosensor. *Microchem. J.* **2017**, *133*, 81–89. [CrossRef]
58. Akbari Javar, H.; Garkani-Nejad, Z.; Dehghannoudeh, G.; Mahmoudi-Moghaddam, H. Development of a New Electrochemical DNA Biosensor Based on Eu<sup>3+</sup>-doped NiO for Determination of Amsacrine as an Anti-Cancer Drug: Electrochemical, Spectroscopic and Docking Studies. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1133*, 48–57. [CrossRef]
59. Temerk, Y.; Ibrahim, H. Electrochemical Studies and Spectroscopic Investigations on the Interaction of an Anticancer Drug Flutamide with DNA and Its Analytical Applications. *J. Electroanal. Chem.* **2015**, *736*, 1–7. [CrossRef]
60. Kumar, A.; Vashistha, V.K.; Tevatia, P.; Singh, R. Electrochemical Studies of DNA Interaction and Antimicrobial Activities of MnII, FeIII, CoII and NiII Schiff Base Tetraazamacrocyclic Complexes. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *176*, 123–133. [CrossRef]
61. Lima, D.; Hacke, A.C.M.; Inaba, J.; Pessoa, C.A.; Kerman, K. Electrochemical Detection of Specific Interactions between Apolipoprotein E Isoforms and DNA Sequences Related to Alzheimer's Disease. *Bioelectrochemistry* **2020**, *133*, 107447. [CrossRef]
62. Zheng, Y.; Xu, Y.; Lin, L.; Li, Y.; Chen, W.; Chen, J.; Lei, Y.; Lin, L.; Liu, A.; Lin, X.; et al. Nanoporous Gold Electrode Prepared from Two-Step Square Wave Voltammetry (SWV) and Its Application for Electrochemical DNA Biosensing of Lung Resistance Related Protein (LRP) Gene. *J. Electroanal. Chem.* **2019**, *840*, 165–173. [CrossRef]
63. De Carvalho, P.A.V.; Campelo Lopes, I.; Silva, E.H.C.; Bruzaca, E.E.S.; Alves, H.J.; Lima, M.I.S.; Tanaka, A.A. Electrochemical Behaviour of Anticancer Drug Lomustine and in Situ Evaluation of Its Interaction with DNA. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *176*, 112786. [CrossRef]
64. Oliveira-Brett, A.M.; Vivan, M.; Fernandes, I.R.; Piedade, J.A.P. Electrochemical Detection of in Situ Adriamycin Oxidative Damage to DNA. *Talanta* **2002**, *56*, 959–970. [CrossRef]
65. Kurbanoglu, S.; Dogan-Topal, B.; Hlavata, L.; Labuda, J.; Ozkan, S.A.; Uslu, B. Electrochemical Investigation of an Interaction of the Antidepressant Drug Aripiprazole with Original and Damaged Calf Thymus DsDNA. *Electrochim. Acta* **2015**, *169*, 233–240. [CrossRef]
66. De Oliveira, S.C.B.; Diculescu, V.C.; Chioresa Paquim, A.M.; Oliveira-Brett, A.M. Electrochemical Biosensors for DNA-Drug Interactions. In *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*; Wandelt, K., Ed.; Elsevier: Oxford, UK, 2018; pp. 124–139. ISBN 978-0-12-809894-3.
67. Kaur, H.; Bhosale, A.; Shrivastav, S. Biosensors: Classification, Fundamental Characterization and New Trends: A Review. *Int. J. Health Sci. Res.* **2018**, *8*, 315–333.
68. Zhang, J.; Zhang, X.; Wei, X.; Xue, Y.; Wan, H.; Wang, P. Recent Advances in Acoustic Wave Biosensors for the Detection of Disease-Related Biomarkers: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1164*, 338321. [CrossRef] [PubMed]
69. Wang, Y.; Zhao, J.; Yang, T.; Zhang, Y.; Tao, D.; Hasebe, Y.; Zhang, Z. Electrochemical Evaluation of Sulfide Mineral Modified Glassy Carbon Electrode as Novel Mediated Glucose Biosensor. *J. Electroanal. Chem.* **2021**, *894*, 115357. [CrossRef]
70. Thévenot, D.R.; Toth, K.; Durst, R.A.; Wilson, G.S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification I. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 121–131. [CrossRef]
71. Labuda, J.; Brett, A.M.O.; Evtugyn, G.; Fořta, M.; Mascini, M.; Ozsoz, M.; Palchetti, I.; Paleček, E.; Wang, J. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 1161–1187. [CrossRef]
72. Hamidi-Asl, E.; Palchetti, I.; Hasheminejad, E.; Mascini, M. A Review on the Electrochemical Biosensors for Determination of MicroRNAs. *Talanta* **2013**, *115*, 74–83. [CrossRef] [PubMed]
73. Bagnì, G.; Osella, D.; Sturchio, E.; Mascini, M. Deoxyribonucleic Acid (DNA) Biosensors for Environmental Risk Assessment and Drug Studies. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *573–574*, 81–89. [CrossRef]

74. Zheng, X.; Zhang, F.; Wang, K.; Zhang, W.; Li, Y.; Sun, Y.; Sun, X.; Li, C.; Dong, B.; Wang, L.; et al. Smart Biosensors and Intelligent Devices for Salivary Biomarker Detection. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2021**, *140*, 116281. [CrossRef]
75. Yu, H.; Guo, W.; Lu, X.; Xu, H.; Yang, Q.; Tan, J.; Zhang, W. Reduced Graphene Oxide Nanocomposite Based Electrochemical Biosensors for Monitoring Foodborne Pathogenic Bacteria: A Review. *Food Control* **2021**, *127*, 108117. [CrossRef]
76. Xie, X.; Zhou, B.; Zhang, Y.; Zhao, G.; Zhao, B. A Multi-Residue Electrochemical Biosensor Based on Graphene/Chitosan/Parathion for Sensitive Organophosphorus Pesticides Detection. *Chem. Phys. Lett.* **2021**, *767*, 138355. [CrossRef]
77. Nut, Y.; Gaffar, S.; Hartati, Y.W.; Subroto, T. Applications of Electrochemical Biosensor of Aptamers-Based (APTASENSOR) for the Detection of Leukemia Biomarker. *Sens. Bio-Sens. Res.* **2021**, *32*, 100416. [CrossRef]
78. Zhou, X.; Pu, Q.; Yu, H.; Peng, Y.; Li, J.; Yang, Y.; Chen, H.; Weng, Y.; Xie, G. An Electrochemical Biosensor Based on Hemin/G-Quadruplex DNzyme and PdRu/Pt Heterostructures as Signal Amplifier for Circulating Tumor Cells Detection. *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, *599*, 752–761. [CrossRef] [PubMed]
79. Asadi, Z.; Mandegani, Z.; Asadi, M.; Pakiari, A.H.; Salarhaji, M.; Manassir, M.; Karbalaei-Heidari, H.R.; Rastegari, B.; Sedaghat, M. Substituted Effect on Some Water-Soluble Mn(II) Salen Complexes: DNA Binding, Cytotoxicity, Molecular Docking, DFT Studies and Theoretical IR & UV Studies. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, *206*, 278–294. [CrossRef]
80. Mukherjee, A.; Mondal, S.; Singh, B. Spectroscopic, Electrochemical and Molecular Docking Study of the Binding Interaction of a Small Molecule 5H-Naptho[2,1-f][1,2] Oxathieaphine 2,2-Dioxide with Calf Thymus DNA. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *101*, 527–535. [CrossRef]
81. Janjua, N.K.; Akhter, Z.; Jabeen, F.; Iftikhar, B. Cyclic Voltammetric Investigation of Interactions between Bisnitroaromatic Compounds and Ds-DNA. *J. Korean Chem. Soc.* **2014**, *58*, 153–159. [CrossRef]
82. Jabeen, E.; Janjua, N.K.; Ahmed, S.; Tahiri, I.; Kashif, M.; Javed, A. DNA Binding Interaction Studies of Flavonoid Complexes of Cu(II) and Fe(II) and Determination of Their Chemotherapeutic Potential. *Inorg. Chim. Acta* **2019**, *496*, 119048. [CrossRef]
83. Chevion, S.; Roberts, M.A.; Chevion, M. The Use of Cyclic Voltammetry for the Evaluation of Antioxidant Capacity. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *28*, 860–870. [CrossRef]
84. Hussam, A. Voltammetry: Dynamic electrochemical techniques. In *Comprehensive Analytical Chemistry*; Ahuja, S., Jespersen, N., Eds.; Modern Instrumental Analysis; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2006; Volume 47, pp. 661–689.
85. Chylewska, A.; Dąbrowska, A.; Ramotowska, S.; Maciejewska, N.; Olszewski, M.; Bagiński, M.; Makowski, M. Photosensitive and pH-Dependent Activity of Pyrazine-Functionalized Carbazole Derivative as Promising Antifungal and Imaging Agent. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–13. [CrossRef]
86. Ramotowska, S.; Zarzecka, D.; Dąbrowska, I.; Woślo, A.; Niedziałkowski, P.; Czaczyk, E.; Grobelna, B.; Ossowski, T. Hydrogen Bonding and Protonation Effects in Amino Acids' Anthraquinone Derivatives—Spectroscopic and Electrochemical Studies. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, *222*, 117226. [CrossRef] [PubMed]
87. Chylewska, A.; Biedulska, M.; Głębocka, A.; Raczynska, E.D.; Makowski, M. Drug-like Properties and Complete Physicochemical Profile of Pyrazine-2-amidoxime: A Combined Multi-Experimental and Computational Studies. *J. Mol. Liq.* **2019**, *276*, 453–470. [CrossRef]
88. Ramotowska, S.; Wysocka, M.; Brzeski, J.; Chylewska, A.; Makowski, M. A Comprehensive Approach to the Analysis of Antibiotic-Metal Complexes. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2020**, *123*, 115771. [CrossRef]
89. Qin, D.-A.; Cai, X.-Q.; Miao, Q.; Wang, Z.-H.; Hu, M.-L. Cyclic Voltammetry and Molecular Docking Study of the Interactions of Two Derivatives of 5-Fluorouracil with DNA. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2014**, *9*, 1608–1620.
90. Tajik, S.; Taher, M.A.; Beitollahi, H.; Torkzadeh-Mahani, M. Electrochemical Determination of the Anticancer Drug Taxol at a Ds-DNA Modified Pencil-Graphite Electrode and Its Application as a Label-Free Electrochemical Biosensor. *Talanta* **2015**, *134*, 60–64. [CrossRef] [PubMed]
91. Nasir, M.H.; Jabeen, E.; Qureshi, R.; Arsari, F.L.; Shaukat, A.; Nasir, U.; Ahmed, A. Investigation of Redox Mechanism and DNA Binding of Novel 2-(x-Nitrophenyl)-5-Nitrobenzimidazole (x = 2, 3 and 4). *Biophys. Chem.* **2020**, *258*, 106316. [CrossRef] [PubMed]
92. Aslanoglu, M. Electrochemical and Spectroscopic Studies of the Interaction of Proflavine with DNA. *Anal. Sci.* **2006**, *22*, 439–443. [CrossRef]
93. Li, N.; Ma, Y.; Yang, C.; Guo, L.; Yang, X. Interaction of Anticancer Drug Mitoxantrone with DNA Analyzed by Electrochemical and Spectroscopic Methods. *Biophys. Chem.* **2005**, *116*, 199–205. [CrossRef]
94. Hajian, R.; Hossaini, P.; Mehryar, Z.; Woi, P.M.; Shams, N. DNA-Binding Studies of Valrubicin as a Chemotherapy Drug Using Spectroscopy and Electrochemical Techniques. *J. Pharm. Anal.* **2017**, *7*, 176–180. [CrossRef]
95. Pešić, M.; Bugariновиć, J.; Minić, A.; Novaković, S.B.; Bogdanović, G.A.; Todosijević, A.; Stevanović, D.; Damljanović, I. Electrochemical Characterization and Estimation of DNA-Binding Capacity of a Series of Novel Ferrocene Derivatives. *Bioelectrochemistry* **2020**, *132*, 107412. [CrossRef]
96. Langer, A.; Schräml, M.; Strasser, R.; Daub, H.; Myers, T.; Heindl, D.; Rant, U. Polymerase/DNA Interactions and Enzymatic Activity: Multi-Parameter Analysis with Electro-Switchable Biosurfaces. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12066. [CrossRef]
97. Cléry, A.; Sohier, T.J.M.; Welle, T.; Langer, A.; Allain, F.H.T. SWITCHSENSE: A New Technology to Study Protein-RNA Interactions. *Methods* **2017**, *118–119*, 137–145. [CrossRef] [PubMed]



Contents lists available at ScienceDirect

Polyhedron

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/poly](http://www.elsevier.com/locate/poly)

## Sulfonamides differing in the alkylamino substituent length – Synthesis, electrochemical characteristic, acid-base profile and complexation properties

Aleksandra Giesielska, Małgorzata Gawrońska, Mariusz Makowski<sup>\*</sup>, Sandra Ramotowska<sup>\*</sup>

University of Gdańsk, Faculty of Chemistry, Wita Stwosza 63, 80-306 Gdańsk, Poland

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Sulfonamides  
 $pK_a$   
Electrochemistry  
Ruthenium(III) complexes  
Rhodium(III) complexes

## ABSTRACT

Two sulfonamide derivatives differing in the length of alkylamino substituent (NethylS and NpropylS) had been synthesized and then their structure and physicochemical properties were the subject of our extensive research. The complete spectroscopic and electrochemical profiles of studied compounds together with their ionic species assignment were established as well as reported. The electrochemical characteristics of sulfonamides were examined in both aqueous and aprotic solvents using cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry technique (DPV). Furthermore, the pH effect on the NethylS/NpropylS redox processes and spectroscopic properties were also studied. The  $pK_a$  values of compounds were determined using the combined pH-spectrophotometric (micro)titration method. The activity of studied sulfonamide antibiotics was verified by binding them into complexes with d-block metal ions, for which the complexing properties of both NethylS and NpropylS towards ruthenium(III) and rhodium(III) ions as well as their corresponding stability constants were determined.

## 1. Introduction

Nowadays, the problem of drug resistance is becoming more and more common. This phenomenon is partially caused by easy access to pharmaceuticals and consequently, their abuse. Designing new compounds with antibacterial properties and modifying those with proven activity is, therefore, an extremely important direction of research all over the world. One group of compounds with proven antibacterial activity are the sulfonamides, which contain the  $-SO_2NH_2$  moiety in their structure [1–3]. They are structural analogs of *p*-aminobenzoic acid (PABA) and, through a competitive mechanism, they inhibit the metabolism of the folic acid and, as a consequence limit cell proliferation [4,5]. Sulfonamides are used in the treatment of nocardiosis and acute urinary tract infections caused by several microorganisms like *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. Additional modifications of the sulfonamide group allow for the extension of their biological activity of antifungal, anti-inflammatory, antitumor, and antiviral properties [6–8].

Moreover, sulfonamides are capable to form complexes with biologically important metal ions, which can be applied in the search and design of new pharmaceuticals. Such coordination connections may also

exhibit enhanced or modified (compared to the unbound ligands) biological activity [9–11]. The selection and coupling of the appropriate metal ion and coordinating ligand are crucial. The stimulation and enhancement of the antibacterial activity of sulfonamide drugs by binding them into complexes with ruthenium(III) ions have already been proven [12]. Ruthenium(II/III) ions are also known for their anti-cancer activity [13–19]. Another, very interesting alternative to Ru complexes is the so far little-known chemistry of pharmaceutical applications of Rh, Ir, and Os metal ions. There are a few reports in the literature describing the use of complex combinations of mentioned metal ions in medicine [20–22]. The results obtained so far suggest that they can be used in the treatment of neoplasms [23].

Analyzing the physicochemical profile of compounds with potential biological use is extremely important for understanding their mode of action as well as determining the most favorable conditions for achieving their maximum pharmaceutical effects. Determination of the acid dissociation constant values ( $pK_a$ ) of analyte binding ligands is necessary to describe their behavior in a solvent. This allows determining the ability of compounds to penetrate cell membranes and identify the protolytic form of the compound in the intracellular medium. This also indirectly provides information about the ability of a

<sup>\*</sup> Corresponding authors.

E-mail addresses: [mariusz.makowski@ug.edu.pl](mailto:mariusz.makowski@ug.edu.pl) (M. Makowski), [sandra.ramotowska@ug.edu.pl](mailto:sandra.ramotowska@ug.edu.pl) (S. Ramotowska).

<https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.115868>

Received 14 March 2022; Accepted 24 April 2022

Available online 4 May 2022

0277-5387/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



molecule to interact with other molecules e.g. their ability to form complexes with metal ions.

Knowing the characteristics of the electrochemical processes of pharmaceuticals can help in obtaining valuable information about the biological activity of compounds [24]. The mechanism of action of some biologically active compounds is related to their redox activity [25,26]. An absolute correlation between redox behavior and biological activity cannot be developed due to several factors, e.g. solubility, metabolism, absorption, and binding sites. Nevertheless, the characterization of electrochemical processes provides valuable information on the behavior of the studied compounds. Relationships between parameters of the redox process of a compound and its antimicrobial [26] or anti-neoplastic [27] activities were confirmed. In the case of metal ion complexes with possible anti-tumor activity, their electrochemical properties are important due to the strongly reducing environment in tumor cells [28]. Under such conditions, the oxidation state of the metal cation may be reduced, which in turn may affect the bioactivity of the complex [29,30]. Electrochemical methods are also willingly used in the study of interactions of small molecule compounds with DNA which is the molecular target of many pharmaceutical compounds [31].

Therefore, in this article, we present the synthesis of two sulfonamides differing in the length of the carbon chain in the alkyamino substituent: 4-Amino-N-(2-aminoethyl)benzenesulfonamide (NethylIS) and 4-Amino-N-(3-aminopropyl)benzenesulfonamide (NpropylIS) (Fig. 1). We discuss their characteristics with particular emphasis on: (i) electrochemical profile both in the water which reflects typical cellular media, as well as in an aprotic solvent which may mimic a specific enzyme or membrane environment, (ii) influence of pH on the redox processes and spectroscopic properties, (iii) ionic forms that are present in the solution and  $pK_a$  values of tested sulfonamides (iv) complexation properties and stability of complexes formed with cations of Ru(III) and Rh(III).

## 2. Experimental

### 2.1. Materials and apparatus

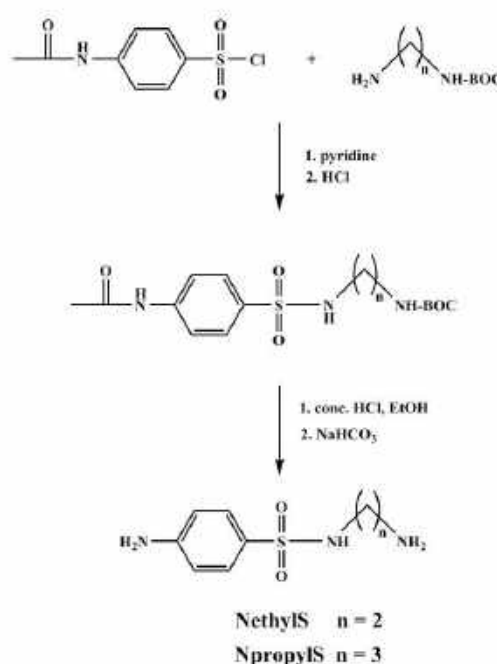
All chemicals and solvents used for synthesis were purchased from commercial suppliers and applied directly in the experiment without further purification. *N*-acetylsulfanyl chloride, *N*-Boc-ethylenediamine, *N*-Boc-1,3-propanediamine, hydrogen chloride solution (2.0 M in diethyl ether) and anhydrous pyridine were purchased from Sigma-Aldrich, methanol, and ethyl acetate from POCH.  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on Bruker AVANCE III (500 MHz) spectrometer. Chemical shifts were reported in parts per million relative to residual solvent peaks ( $\text{DMSO}-d_6 = 2.50$  ppm).  $^1\text{H}$  NMR coupling constants ( $J$ ) were reported in Hertz (Hz), and multiplicity was indicated as the following: s (singlet), bs (broad singlet), d (doublet), t (triplet) and qu (quintet). The infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum Two FT-IR spectrometer using an attenuated total reflectance (ATR) module with a diamond crystal in the spectral range of  $4000 \pm 400$   $\text{cm}^{-1}$ . The intensity of FT-IR bands was indicated as s (strong), m (medium), w (weak) and vibration type as:  $\nu$  (stretching),  $\nu_s$  (symmetric

stretch),  $\nu_{as}$  (antisymmetric stretch),  $\delta$  (bending). The elemental analysis (CHNS) was recorded on an Elementar Vario El Cube analyzer. Mass spectra (MS) were recorded on a Bruker Daltonics (HCT Ultra) instrument. Analytical TLC was performed on aluminum sheets of silica gel UV – 254 Merck and visualized with a UV lamp at 254 nm. Electrochemical measurements were carried out using an Autolab PGSTAT204 potentiostat/galvanostat (Metrohm Autolab B.V., The Netherlands), which is controlled by the Nova software. UV-Vis spectra were recorded using Evolution 300 (Thermo Scientific, USA) spectrophotometer. Twice distilled water (Hydrolab-Reference purified) was used for preparing all studied solutions.

### 2.2. Synthesis of 4-Amino-N-(2-aminoethyl)benzenesulfonamide, 4-Amino-N-(3-aminopropyl)benzenesulfonamide

The synthesis pathway for two sulfonamide derivatives (based on the procedure described elsewhere [32]) is presented in Scheme 1.

The 6.3 mmol of 4-acetamidobenzene-1-sulfonyl chloride was



Scheme 1. Synthetic route of sulfonamides Ac-NethylIS-BOC, NethylIS, Ac-NpropylIS-BOC, and NpropylIS.

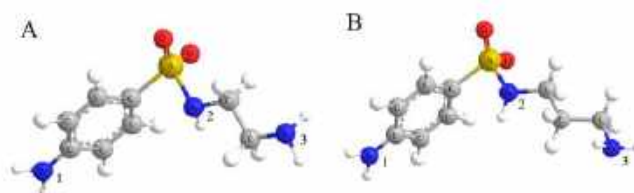


Fig. 1. Structures of A. 4-Amino-N-(2-aminoethyl)benzenesulfonamide (NethylIS) and B. 4-Amino-N-(3-aminopropyl)benzenesulfonamide (NpropylIS) with the labeling of nitrogen atoms used in the paper as a reference, generated in the Chem3D® program.

suspended in 10 mL of anhydrous pyridine and then appropriate *N*-Boc-amine (6.0 mmol) was added. The reaction mixture was heated at 60 °C for 4 h. The progress of the reaction was monitored by thin-layer chromatography (TLC) on Silica Gel (Merck) in chloroform–methanol–ammonia (25%) (v/v/v = 5:1:0.1) system solvent. After completion of the reaction, the mixture was poured into ice water and acidified with 1 M HCl. A yellow oil was obtained which solidified overnight. The solid product was separated from the liquid phase by filtering and then washed with water and dried on air at room temperature. Ac-NethylS-BOC and Ac-NpropylS-BOC compounds were obtained as yellow solids with 50% and 54.0% yield, respectively.

To the ethanolic solutions (2 mL) of Ac-NethylS-BOC and Ac-NpropylS-BOC (1 mmol) the 1 mL of concentrated HCl was added. The reaction mixture was stirred at 70 °C overnight, next diluted with water, and alkalinized with NaHCO<sub>3</sub> to pH 8. The reaction progress was monitored by thin-layer chromatography (TLC) on Silica Gel (Merck) in chloroform–methanol–ammonia (25%) (v/v/v = 5:1:0.1) system solvent. The solution was evaporated and the residue was purified by column chromatography (Silica gel, Merck) in the solvent system successively: ethyl acetate – methanol 50:1; 40:1; 30:1; 20:1; 10:1; 5:1; 2:1 (v/v). NethylS and NpropylS were converted into their dihydrochloride as follows: to the solution of the compound in the mixture of ethyl acetate – methanol, a slight molar excess of hydrogen chloride solution in ethyl ether (2.0 M in diethyl ether) was added dropwise at room temperature. The white for NethylS and brown for NpropylS solids precipitated by anhydrous ethyl ether were separated and ultimately obtained with 43% and 40% yield, respectively. Their structures in the form of dihydrochloride derivatives were checked and confirmed by mass spectrometry (MS), spectroscopic (FT – IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR), and elemental analysis (CHNS). The description of the analysis results are below and all spectra are included in [supplementary materials](#) (Figs. S1–S3).

### 2.2.1. 4-Amino-*N*-(2-aminoethyl)benzenesulfonamide dihydrochloride (NethylS)

**Anal. Calcd.** (%) for C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>SCl<sub>2</sub> (288.15): C, 33.34; H, 5.25; N, 14.58; S, 11.13;

**Found** (%): C, 34.87; H, 5.35; N, 14.59; S, 11.32.

**ESI-MS** *m/z*: 216.0 [M + H];

**FT-IR ATR** (cm<sup>-1</sup>) selected bands: 3302 (w) ν(NH of SO<sub>2</sub>NH), 2859 (m) ν(NH<sub>2</sub>), 1597 (w) δ(NH<sub>2</sub>), 1552 (w) ν(C=C)<sub>Ar</sub>, 1489 (s) ν(C=C)<sub>Ar</sub>, 1444 (w) δ(CH<sub>2</sub>), 1324 (s) ν<sub>as</sub>(SO<sub>2</sub>), 1146 (s) ν<sub>s</sub>(SO<sub>2</sub>), 634 (m) ν(S–N);

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.81 (qu, 2H, *J* = 6.22 Hz); 2.93 (t, 2H, *J* = 6.62 Hz); 6.76 (bs, 2H, –NH); 6.86 (d, 2H, *J* = 8.57 Hz); 7.48 (d, 2H, *J* = 8.71 Hz); 7.66 (s, 1H, –SO<sub>2</sub>NH); 8.11 (s, 3H, –NH);

**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 38.98; 40.30; 115.82; 128.10; 129.06; 149.70 ppm.

### 2.2.2. 4-Amino-*N*-(3-aminopropyl)benzenesulfonamide dihydrochloride (NpropylS)

**Anal. Calcd.** (%) for C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>SCl<sub>2</sub> (302.22): C, 35.77; H, 5.67; N, 13.9; S, 10.61;

**Found** (%): C, 33.69; H, 5.36; N, 12.87; S, 10.21.

**ESI-MS** *m/z*: 230.0 [M + H];

**FT-IR ATR** (cm<sup>-1</sup>) selected bands: 3245 (w) ν(NH of SO<sub>2</sub>NH), 2886 (m) ν(NH of NH<sub>2</sub>), 1597 (m) δ(NH of NH<sub>2</sub>), 1554 (w) ν(C=C)<sub>Ar</sub>, 1488 (s) ν(C=C)<sub>Ar</sub>, 1441 (m) δ(CH of CH<sub>2</sub>), 1301 (s) ν<sub>as</sub>(SO<sub>2</sub>), 1143 (s) ν<sub>s</sub>(SO<sub>2</sub>), 665 (s) ν(S–N);

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.69 (qu, 2H, *J* = 7.44 Hz); 2.76 (t, 4H, *J* = 7.16 Hz); 6.86 (d, 2H, *J* = 8.47 Hz); 7.45 (s, 1H, –SO<sub>2</sub>NH); 7.53 (d, 2H, *J* = 8.46 Hz); 8.08 (s, 3H, –NH);

**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 27.83; 36.98; 40.50; 115.90; 128.62; 129.13; 147.26 ppm.

The <sup>1</sup>H NMR spectra of (Fig. S1) NethylS and NpropylS show signals of both sulfonamide derivatives in the region between 6.85 and 7.67 ppm, which are assigned to aromatic protons. The presence of aliphatic

protons was observed in the region between 1.65 and 2.98 ppm. The singlet peaks at 7.67 ppm for NethylS and 7.50 ppm for NpropylS are assigned to protons of the sulfonamide –SO<sub>2</sub>NH– group. The proton of the amine –NH<sub>2</sub>– group manifests its presence as a singlet peak at 6.76 and 8.11 ppm for NethylS and 8.08 ppm for NpropylS. In <sup>13</sup>C NMR spectra, the aromatic carbons of both derivatives showed signals in the region between 115.79 and 149.70 ppm, whereas aliphatic carbons in the region were between 27.83 and 40.50 ppm. The FT-IR spectra of NethylS and NpropylS contain characteristic bands of the vibrations of sulfonamide group –SO<sub>2</sub>NH–, primary ammonium group –NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (Fig. S2). The broad bands in the range of 3390–2750 cm<sup>-1</sup> are assigned to the N–H stretching vibrations of the primary ammonium group (–NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). SO<sub>2</sub> asymmetric and symmetric stretching vibrations can be observed in the range of 1340–1300 cm<sup>-1</sup> and 1175–1137 cm<sup>-1</sup> for NethylS and NpropylS, respectively. The stretching vibration bands of aromatic rings ν(C=C) come in the region of 1580–1479 cm<sup>-1</sup>, and those for ν(S–N) in the region of 635–718 cm<sup>-1</sup>.

### 2.3. Chloride content determination

Determination of chloride content in NethylS and NpropylS compounds was performed by standard addition method using the CerkoLab automatic controlled microtitrator, equipped with a silver chloride electrode (Schott). A solution was prepared to contain a known amount of standard (NaCl) and 2.5·10<sup>-5</sup> M NethylS/NpropylS in an aqueous solution and a volume of 10 mL. While performing the potentiometric titrations the system sequentially recorded the potential and dispensed the titrant (AgNO<sub>3</sub>, 0.1 M) portions at a constant volume (0.008359 mL) from the syringe (1 mL; Hamilton). Each potentiometric measurement consisted of 120 steps.

### 2.4. Voltammetric measurements

A single-compartment, three-electrode cell was used for all cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) measurements. The working electrode was a glassy carbon (GC) electrode of 2 mm diameter. The electrode was carefully polished before each experiment using a 0.5 μm alumina suspension (Buehler). A platinum wire served as an auxiliary electrode. All potentials were measured using a stable silver/silver chloride (Ag/AgCl) electrode in an aqueous sodium chloride solution (1 M NaCl) as a reference electrode. This basic system was suitable for the study in an aqueous solution. For measurements in non-aqueous media (DMSO, DMF) a double electrolytic key was introduced (a double junction electrode was used). The basic silver chloride electrode was additionally placed in methanolic tetrabutylammonium perchlorate (0.1 M TBAP). For all voltammetric measurements, approximately 1·10<sup>-5</sup> M sulfonamide solutions were used. 0.1 M TBAP in non-aqueous media or 0.1 M sodium perchlorate (NaClO<sub>4</sub>) in aqueous solutions were used as the primary electrolytes. To analyze the effect of pH on the redox processes, voltammograms were registered at various pHs by adding hydrochloric acid (0.1 M HCl) and potassium hydroxide (0.1 M KOH) solutions. All voltammetric measurements were performed at a temperature of 298 K. Solutions were degassed by passing argon. At the start of the experiment, the cell was held at the start potential for 10 s of quiet time. The reproducibility of the results was ensured by recording the voltammograms several times for each experiment.

### 2.5. Acid-base titrations and determination of p*K*<sub>a</sub> values

A simultaneous pH-spectrometric titration technique was used to determine values of the acid dissociation constant (p*K*<sub>a</sub>) for studied sulfonamides. After the addition of each portion of titrant, the UV-Vis spectrum was in the wavelength range from 200 to 350 nm. For acid-base titrations, approximately 6·10<sup>-5</sup> M sulfonamide solutions dissolved in 5.27·10<sup>-2</sup> M HCl were titrated with 2.09·10<sup>-2</sup> M KOH. The pH values during measurement were obtained by potentiometric titrations

performed with the microtitration automatic system Cerko-Lab, equipped with a Hydromet pH electrode and a 1 mL Hamilton syringe. The resolution of the voltage measurement was <0.1 mV. All measurements were performed at 298 K temperature. Acid dissociation constant values were calculated with the form of the Henderson–Hasselbach equation (1) implemented into Origin Lab software:

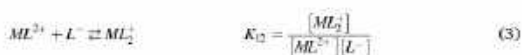
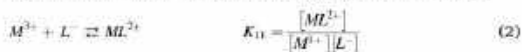
$$A = \frac{A_1 + A_2 \cdot 10^{(pH - pK_{a1})}}{10^{(pH - pK_{a1})} + 1} + \frac{A_2 + A_3 \cdot 10^{(pH - pK_{a2})}}{10^{(pH - pK_{a2})} + 1} + \frac{A_3 + A_4 \cdot 10^{(pH - pK_{a3})}}{10^{(pH - pK_{a3})} + 1} \quad (1)$$

where  $A_n$  is the absorbance of various protolytic forms. Measurements and determination of  $pK_a$  values are based on the change in absorptions intensity as a function of the pH of the solution [24,33–35].

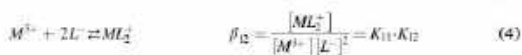
2.6. Complexation with metal ions and determination of stability constants values.

Studies on the complexing properties of NethylS and NpropylS compounds with ruthenium(III) and rhodium(III) ions were carried out using potentiometric titration. A solution was prepared to contain  $1.0 \cdot 10^{-3}$  M  $RuCl_3$  or  $RhCl_3$  and  $3.0 \cdot 10^{-3}$  M NethylS or NpropylS in  $2.5 \cdot 10^{-2}$  M HCl (volume of 4 mL). The measurements were performed using the CerkoLab automatic controlled microtitrator, equipped with a pH electrode (Hydromet) with  $E = 402.18$  mV and  $S = -57.82$  mV per pH unit calibration parameters. While performing the potentiometric titrations the system sequentially recorded the potential and dispensed the titrant (KOH; 0.1 M) portions at a constant volume (0.004162 mL) from the syringe (0.5 mL; Hamilton). Each potentiometric measurement consisted of 120 steps.

The gradual and cumulative stability constants of complex compounds were determined using the CVEQUID computational program by A. Liwo and J. Kostrowicki [36,37]. It is based on the algorithm in which the equilibrium model of the solution is described based on the measurement data. The unknown parameters are selected so that the data obtained experimentally coincide with the assumed equilibrium model. The stability gradual constants ( $K_{11}$  and  $K_{12}$ ), describing the consecutive formation of a complex with a stoichiometry of 1:1 and 1:2 (metal: ligand), can be represented by the following equations (2) and (3):



the cumulative stability constant can be expressed by equation (4):



where  $M^{3+}$  is a metal ion,  $L^-$  – ligand, and  $ML^{2+}$  and  $ML_2^+$  are formed complex ions.

3. Results and discussion

Since the compounds exist as hydrochlorides, potentiometric titration was performed to determine chloride content in NethylS as well as in NpropylS. The number of moles of the compound in the analyzed solution was  $2.5 \cdot 10^{-5}$  mol, while 0.1 M  $AgNO_3$  solution was used as the titrant. The jump in the titration curve is observed at 0.5 mL  $AgNO_3$ . The endpoint of the titration and thus the exact content of chloride ions in the analyzed solution can be read from the diagram of the first derivative (Fig. S4). The number of  $Cl^-$  ions in both cases is equal to  $5 \cdot 10^{-5}$  mol, indicating the presence of two HCl groups in both ligands.

In the electrochemical measurements, the type of solvent can strongly influence the course of the redox processes that take place. The

study of redox processes in aprotic media provides important information, as it allows for the registration of signals resulting only from the detachment of subsequent electrons [38,39]. The absence of a proton donor atom prevents the protonation of redox forms and the influence of additional hydrogen bonds, and thus allows the observation of created forms in the consequent stages. Moreover, the nonaqueous environment may mimic the local environment found, for example, in membranes or enzymes and other biologically important substances, in which the  $pK_a$  values differ significantly from the values in water as these media are lipophilic rather than hydrophilic [40,41].

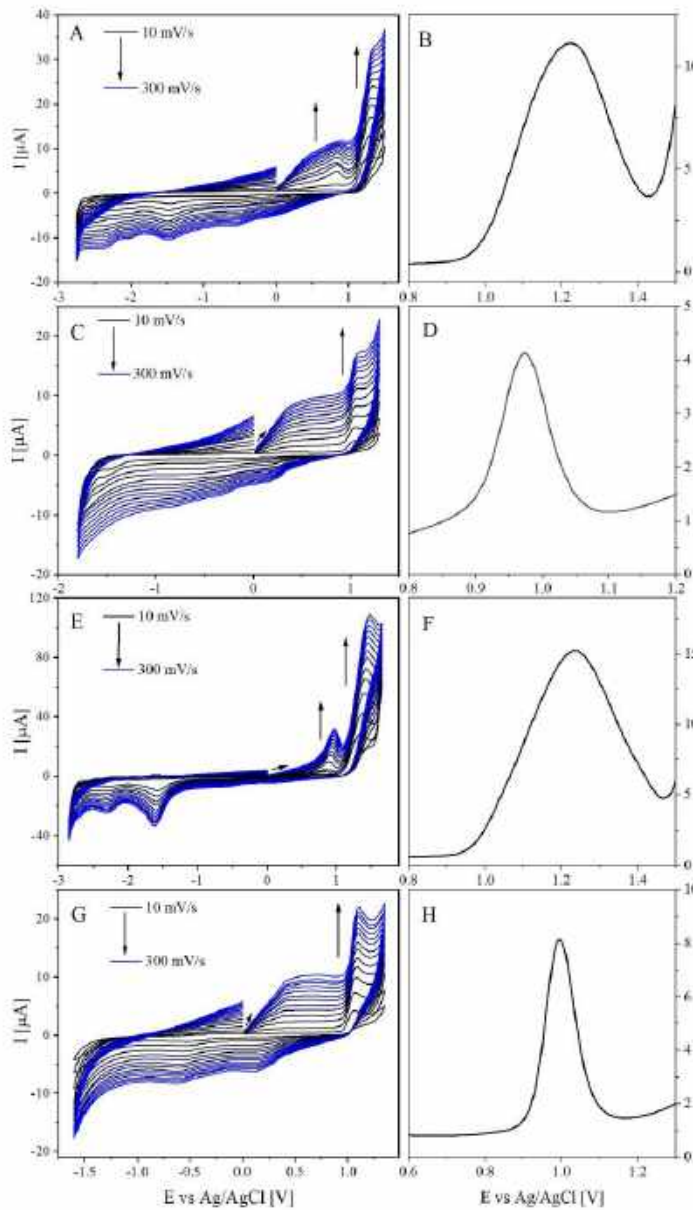
Two anode peaks were observed for both tested compounds registered in the aprotic solvent (DMSO) at the scan rate from 50 mV/s to 100 mV/s (Fig. 2). For NethylS, these signals occur at slightly lower potential values ( $E_{a1} = 0.840$  V,  $E_{a2} = 1.315$  V) than for the NpropylS compound (Table 1), which proves easier oxidation of the derivative with the ethyl chain in the substituent. As the scan rate increases, the  $E_{a2}$  peak value shifts towards more positive potentials (from 1.251 V to 1.350 V) and increases its intensity. The speed of the measurement has a crucial impact on the formation of the  $E_{a1}$  peak, which is invisible at very low scan rates (10–25 mV/s) for both studied compounds, while at rates higher than 100 mV/s it becomes wide and blurred for NethylS. The NpropylS compound is characterized by more distinct and more intense peaks.

Voltammograms of redox processes recorded in water show that in the potential range from 0 to 0.9 V, high currents were recorded for high scanning rates, while no shaped anode peak was observed. A single oxidation peak in water occurs at a potential of 0.973 V and 1.094 V for NethylS and NpropylS, respectively. Differential pulse voltammograms (DPV) in DMSO and water were also recorded for both compounds (Fig. 2). In each case, an oxidation signal was observed, with the potential value consistent with the CV measurements (Table 1).

Furthermore, to determine the influence of the environment on the redox processes of the studied sulfonamides and to correlate the electrochemical effects with their acid-base character, voltammograms of NethylS and NpropylS aqueous solutions at various pH values were registered (Fig. 3). Understanding the acid-base properties of ligands is necessary to describe their behavior in a solvent and indirectly, their ability to form complexes with metal ions.

Measurements were carried out in an aqueous solution in the pH range from 2.80 to 11.56. Portions of 0.1 M acid and 0.1 M alkali were added to the compound solution with a starting pH of 3.69 for NethylS and 3.86 for NpropylS, respectively. The low starting pH values of the compounds solutions are a consequence of their hydrochloride forms. Additional acidification did not change the position or intensity of the signals compared to the original ligand solutions. For the studied sulfonamides registered in the most acidic environment, well-shaped, intense, single oxidation peaks located near the value of the 1 V potential were observed. Said peaks are present in both cyclic and pulse differential voltammograms. Changes in the spectrum upon increasing pH, are more visible on DPVs. They lead to a decrease in the intensity (current value) of the signals, and in the alkaline pH also to the appearance of wide peaks at lower potential values (in the range of approx. 0.6 V – 0.8 V). It proves the essential influence of the alkaline pH on the course of the redox processes taking place.

To describe the spectroscopic properties of studied compounds and assess the conditions for the acid-base titrations, their electronic absorption spectra were recorded (Fig. S5). On their basis, the concentrations of compounds suitable for titration were determined. The corresponding spectra obtained by the addition of HCl and KOH were also recorded to check the influence of acid and base on the shape and intensity of the maxima. Both sulfonamides possess their absorption maxima with a wavelength of about 260 nm (262 nm for NethylS and 261 nm for NpropylS, respectively; Table 2), the position of which did not change after the addition of acid. The maxima of both compounds shifted however towards shorter wavelengths (blue shift) under the influence of the alkali. For NethylS this shift was stronger ( $\Delta\lambda = 5$  nm) and



**Fig. 2.** CV voltammograms of NethylS registered in DMSO at different scan rates (from 10 mV/s to 300 mV/s), B. DPV voltammogram of NethylS registered in DMSO, C. CV voltammograms of NethylS registered in H<sub>2</sub>O at different scan rates (from 10 mV/s to 300 mV/s), D. DPV voltammogram of NethylS registered in H<sub>2</sub>O, E. CV voltammograms of NpropylS registered in DMSO at different scan rates (from 10 mV/s to 300 mV/s), F. DPV voltammograms of NpropylS registered in DMSO, G. CV voltammograms of NpropylS registered in H<sub>2</sub>O at different scan rates (from 10 mV/s to 300 mV/s), H. DPV voltammograms of NpropylS registered in H<sub>2</sub>O.

combined with the hypochromic effect. Nonetheless, in the case of NpropylS, the blue shift was more subtle ( $\Delta\lambda = 2$  nm) and did not reduce band intensity.

The acid dissociation constant provides information about the protolytic form involved in the complexation process. To determine the  $pK_a$  values of the studied compounds, it is necessary to determine the number of equilibria present in the solution and to adopt an appropriate

model of the reaction occurring during the pH-spectrophotometric titration. Three equilibria related to proton dissociation were observed in the solution and assigned to the reactions presented in Fig. 4.

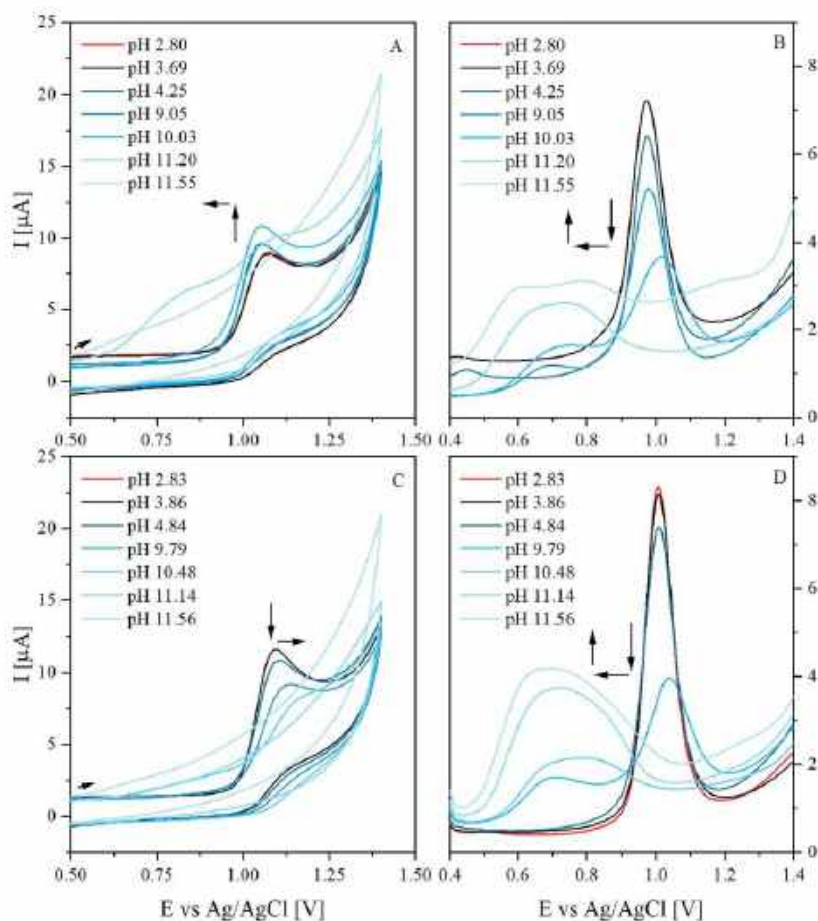
The evidence for the presence of three equilibria in solutions is: (i) the nature of spectroscopic changes during the titrations (Fig. 5A and Fig. 6A), (ii) three straight sections presented in A-diagrams, i.e. graphs showing mutual changes in absorbance at two different wavelengths

**Table 1**  
Values of oxidation potentials  $E_{ox}$  [V] and differences between them  $\Delta E$  [V] for redox processes of the studied derivatives registered in DMSO and water for scan rate  $v = 100$  mV/s.

Compound	$E_{ox1}$ [V]	$E_{ox2}$ [V]	$\Delta E$ [mV]	$E_{ox1}$ [V]	$E_{ox1}$ [V]	$E_{ox2}$ [V]
	CV	CV	CV	CV	DPV	DPV
	DMSO			H <sub>2</sub> O		
NethylS	0.840	1.315	0.473	0.973	1.223	0.973
NpropylS	0.924	1.433	0.509	1.094	1.236	0.995

(Fig. 5B and Fig. 6B), and three inflections in the absorbance (A) versus pH curves (Fig. 5C and Fig. 6C). During the titrations, spectral changes were observed, which were consistent with the above-described behavior of tested compounds in a solution with the addition of acid and base (i.e. change of band intensity and hypsochromic shift). All values of  $pK_a$  resolved from combined pH-spectrophotometric titrations are gathered in Table 2.

For sulfonamides, the  $pK_{a1}$  values associated with the amino group of sulfanilamide moiety are around the value of 2. As for the dissociation reaction of the amide group, the  $pK_{a2}$  values vary between 5.5 and 7.7



**Fig. 3.** Influence of pH on registered redox processes, A. CV voltammograms of NethylS, B. DPV voltammograms of NethylS, C. CV voltammograms of NpropylS, and D. DPV voltammograms of NpropylS. The arrows show the direction of changes on the voltammograms.

**Table 2**  
Wavelengths maxima ( $\lambda_{max}$ ), molar absorption coefficient ( $\epsilon$ ) values, and acid dissociation constant ( $pK_a$ ) values (with standard deviation) determined by the pH-spectrophotometric titration method in water.

Compound	$\lambda_{max}$ [nm]	$\epsilon$ for $\lambda_{max}$ [ $dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ ]	$\lambda_{min}$ [nm] (with acid)	$\lambda_{max}$ [nm] (with alkali)	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$
NethylS	262	16,930	262	257	$2.62 \pm 0.19$	$6.45 \pm 0.21$	$9.67 \pm 0.06$
NpropylS	251	17,060	261	259	$2.11 \pm 0.10$	$6.35 \pm 0.06$	$10.86 \pm 0.19$

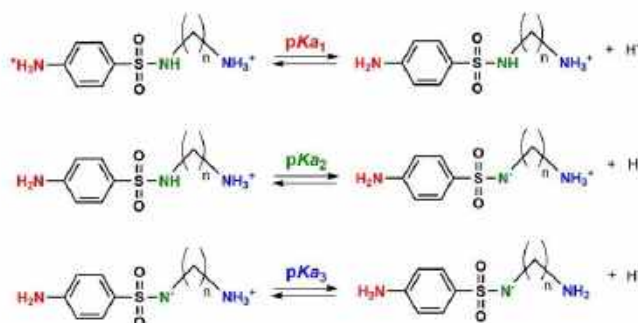


Fig. 4. Dissociation equilibria of Nethyls ( $n = 2$ ) and Npropyls ( $n = 3$ ) with assigned  $pK_a$  constants describe the dissociation of subsequent protons.

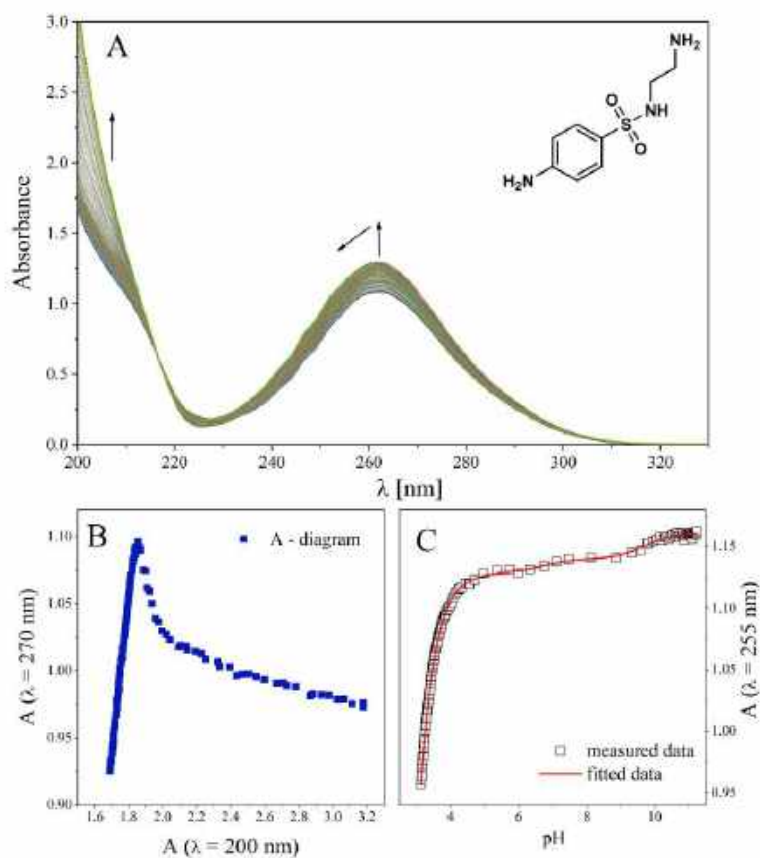


Fig. 5. A. Spectrophotometric acid-base titration curves of Nethyls ( $c = 0.0010^{-5}$  M). The arrows indicate the directions of changes. B. A-diagram presents absorbance change at 270 nm from absorbance change at 200 nm. C. Absorbances ( $A$ ) of Nethyls as a function of the pH at  $\lambda = 255$  nm.

depending on the structure of the substituent, and thus on the whole sulfonamide molecules [42–44]. The obtained results fit well with the ranges of values typical for this group of compounds. The structure of

the substituent (the  $R$  group) attached to the amide group is crucial to the basicity of the entire molecule even despite the large distance between the  $N1$  and  $N3$  amine groups. The length of the alkyl chain in

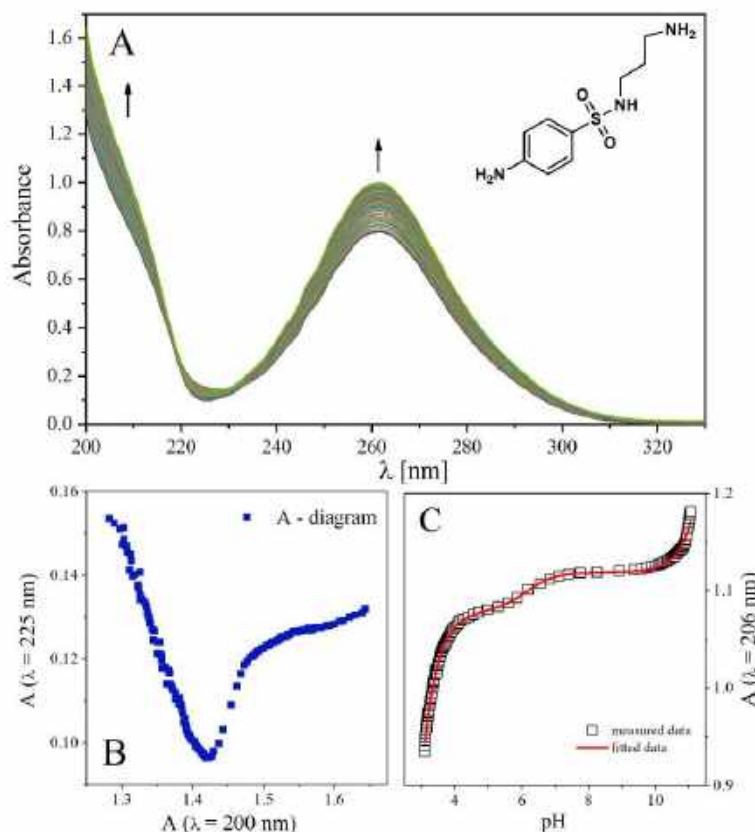


Fig. 6. A. Spectrophotometric acid-base titration curves of NpropylS ( $c = 5.90 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ). The arrows indicate the directions of changes. B. A-diagram absorbance change at 225 nm from absorbance change at 200 nm. C. Absorbance (A) of NpropylS as a function of the pH at  $\lambda = 206 \text{ nm}$ .

studied compounds also demonstrates such an effect, which is reflected in the lower  $pK_{a1}$  value for the derivative with the propyl chain ( $pK_{a1} = 2.62$  and  $2.11$  for NethylS and NpropylS, respectively). This is a consequence of increased distance between the amino group of the substituent and the rest of the molecule, which in turn increases the basicity of the side chain amino group, the protolytic reaction of which is described with the constant  $pK_{a2}$ . The values of this constant were found to be equal to  $9.67$  and  $10.96$  for NethylS and NpropylS, respectively. The smallest differences in the acid-base character were observed for the amide group (N2), where the  $pK_{a2}$  value of the tested derivatives differs only by  $0.1$  unit.

The last and crucial element of our research, which is an introduction to the synthesis of complexes with presented sulfonamide ligands and the investigation of the biological activity of such connections, is the NethylS and NpropylS complexation ability study towards Rh(III) and Ru(III) ions in solution. Since the tested ligands were in the form of hydrochlorides, and the protonation of the donor atoms significantly impedes or completely prevents the process of metal ions complexation, the ligands were activated by deprotonation with the addition of KOH (see section 2.6). The complexation process was accompanied by discoloration of the solutions. Changes in the course of redox processes resulting from complexation were also recorded (Fig. S6). The performed potentiometric titrations enabled the assessment of obtained

complex ions stoichiometry and the calculation of stability constants values. Changes in the potential registered during titrations are presented in Fig. 7 by square points. The calculated data, based on which the values of formed complexes' stability constants were determined, are shown with a red line. There is a good fit between the measured points (squares) and the calculated ones (solid red line) in each case. Standard deviation values in electromotive force (EMF) they were between  $1.3$  and  $1.6 \text{ V}$ .

Since the ligands coordinate sequentially to the metal ion, the 1:1 stoichiometry forms of ML complex are certainly present in the solution, hence the gradual constant  $K_{11}$  values, describing this equilibrium were calculated. The presence of a second gradual equilibrium of complexation (given by  $K_{12}$  constant), associated with the attachment of the second sulfonamide ligand and the formation of the  $ML_2$  complex was also observed. Based on the dependencies between the gradual and cumulative stability constants, the values of the  $\beta_2$  were also determined. All calculated stability constants values are summarized in Table 3.

For all studied coordination forms, the value of  $K_{12}$  is higher than the value of  $K_{11}$ , which confirms the formation of stable complexes with ML stoichiometry 1:2 ( $ML_2$ ). However, for each of the examined ions, the differences in the values of these constants are distinct. In the case of complexes with Rh(III) ion, the values of the constants are:  $K_{11} = 6.85$  and  $K_{12} = 11.36$  for NethylS, and  $K_{11} = 9.78$  and  $K_{12} = 10.74$  for

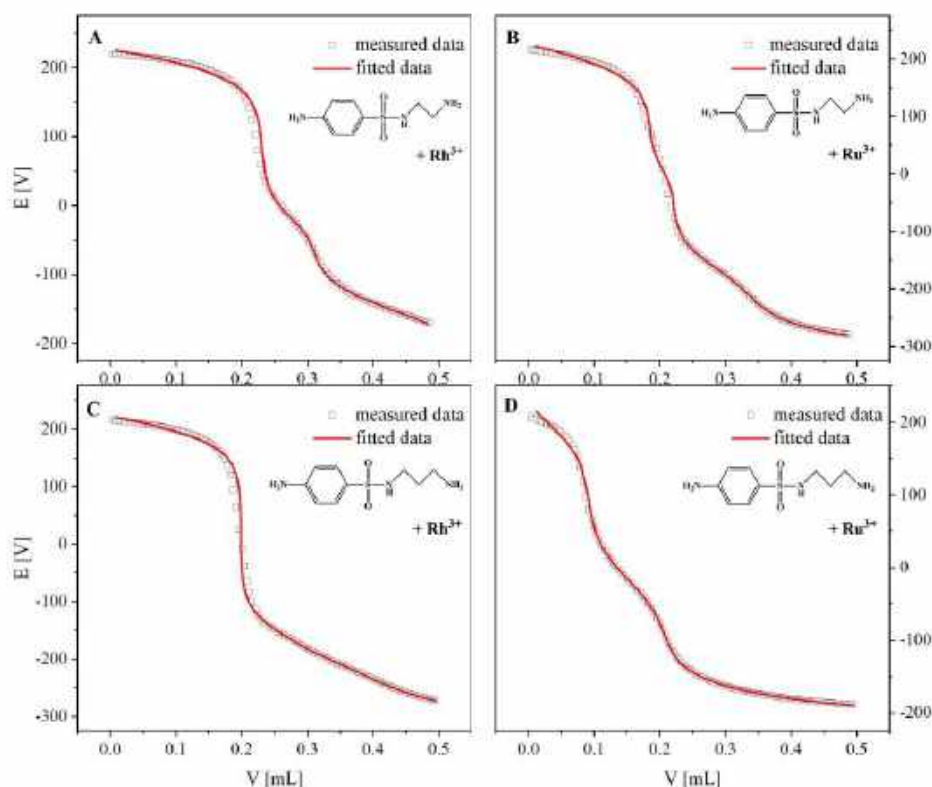


Fig. 7. Plots of a potentiometric titration with KOH ( $c = 0.1$  M) of A. NethylS, C. NpropylS with rhodium(III) ion, and B. NethylS, D. NpropylS with ruthenium(III) ion.

**Table 3**  
Values of gradual ( $K_{11}$  and  $K_{12}$ ) and cumulative ( $\beta_2$ ) stability constants for complexes of studied ligands with rhodium(III) and ruthenium(III) ions.

Compound	Rh <sup>3+</sup>			Ru <sup>3+</sup>		
	log $K_{11}$	log $K_{12}$	log $\beta_2$	log $K_{11}$	log $K_{12}$	log $\beta_2$
NethylS	6.05 ± 1.64	11.96 ± 1.39	18.21	6.95 ± 0.62	12.00 ± 0.53	18.43
NpropylS	8.79 ± 0.88	10.74 ± 0.83	19.51	5.90 ± 1.98	7.29 ± 1.66	13.19

$$^* \log\beta_{12} = \log K_{11} + \log K_{12}$$

NpropylS, respectively. Whereas a higher value of cumulative constant was obtained for NpropylS ( $\beta_2 = 19.51$ ) which proves the greater stability of this complex. As one may notice, the values of the constants for Rh(III) complexes vary depending on the ligand, although not extremely. Crucial differences occur in the case of the coordination forms with Ru(III) ions. The main difference between complexes of two ions is in the value of the  $K_{12}$  constant ( $K_{12} = 12.00$  for NethylS and  $K_{12} = 7.29$  for NpropylS), which implies lesser stability of the  $ML_2$  stoichiometry complex of NpropylS with Ru(III) ions. This also translates into a higher value of the cumulative stability constant ( $\beta_2 = 18.43$ ) in the case of Ru(III) interaction with the NethylS ligand.

Sulfonamides can coordinate metal ions in different ways

[12,45–50]. Known modes of coordination of the metal ion are: (i) chelation through the N atom from the substituent and the O atom of the  $-SO_2NH-$  group occurring in the case of Ru(III)-STZ and Ru(III)-SMZ [12], (ii) chelation through N atom from substituent and the N atom of the ligand  $-SO_2NH-$  group [46], (iii) chelation through the N atom of the aniline  $-NH_2$  group and the N atom of  $-SO_2NH-$  [49], (iv) chelation involves both the oxygen atom and the nitrogen atom from the  $-SO_2NH-$  group [47], (v) coordination through the N atom of the substituent heterocycle ring [50], so the sulfonamide ligand, acts as a monodentate because neither the oxygen atom nor the nitrogen from the  $-SO_2NH-$  group are involved in coordination.

For the studied ligands, the donor atoms that may be involved in the complexation of metal ions are nitrogen atoms (mainly N2 and N3, less likely N1) and possibly the oxygen atom of the  $-SO_2NH-$  group. The flexible structure of the alkylamino substituent and the precondition of ligand activation by deprotonation for complexation suggest that metal cations are coordinated by nitrogen atoms N2 and N3. The proposed coordination mode leads to the formation of stable five-membered (for NethylS) or six-membered (for NpropylS) rings as a result of chelation. The obtained values of cumulative stability constants indicate that in the case of rhodium(III) ions, the more favored form of the complex is the six-membered chelate ring (with NpropylS ligand), while the ruthenium(III) ion prefers to form a five-membered ring by complexing with NethylS.



#### 4. Conclusions

In this work, we report the results of the synthesis of two sulfonamides differing in the length of the alkylamino substituent and their physicochemical characteristics. Their characteristics are discussed, with particular emphasis on the electrochemical profile, acid-base character, and complexing ability towards trivalent rhodium and ruthenium ions. Voltammetric measurements showed the presence of oxidation peaks for studied sulfonamide compounds, both in water and in an aprotic solvent. The ongoing redox processes were pH-dependent, but no significant influence of the speed of the processes on their course was observed. The NpropylS compound was characterized by more distinct and intense peaks than a derivative with a shorter substituent chain (NethylS).

Potentiometric titration results proved the existence of three dissociation equilibria in the solutions of studied ligands, which is consistent with the presence of three acid-base centers in each molecule studied. The determined  $pK_{a1}$  and  $pK_{a2}$  constants are in good agreement with the values known for the sulfonamide derivatives. The structure of the substituent attached to the amide group is crucial to the basicity of the entire molecule. It has been demonstrated that even such a small difference in the structure of the investigated derivatives as  $-CH_2-$  unit in the R-group influences the obtained values of the  $pK_a$  constant describing the dissociation of subsequent protons. Increasing the chain length in the substituent results in an increase in the basicity of the amino group of the nitrogen atom N3, as an effect of that also the  $pK_a$  value corresponding to the amino group (N1) of sulfanilamide moiety is decreased, regardless of the distance separating the two acid-base centers.

Studies on the complexing capacity have shown the formation of complexes characterized by high stability constants values with rhodium(III) and ruthenium(III) ions. For both metal cations, the ML stoichiometry of the coordination forms was defined as 1:2 ( $ML_2$ ). The ion complexation by studied sulfonamides may lead to the formation of chelate rings of different sizes, depending on the length of the alkylamino substituent involved in the coordination process. Our research suggests that in the case of rhodium(III) ion, the preferred form of the complex is the six-membered chelate ring (with NpropylS ligand), while in the case of the ruthenium(III) ions a formation of the five-membered ring as an effect of complexation with NethylS is favored.

Information on the physicochemical profile and complexing capacity of the studied ligands is crucial for further study of these systems, including the synthesis of coordination forms with possibly increased biological activity as compared to sole ligands. The lower stability of the NpropylS complex with Ru(III) ions does not exclude it as a candidate for an effective pharmaceutical, it is quite the opposite. In the case of complex compounds with biological activity, the complex must exhibit sufficiently high stability to enable it to reach the molecular target in a coordinated form. On the other hand, the lability of such a system is also desirable to allow the release of both free ligand molecules and metal ions at the site of drug action. [51–54]. Therefore, the NpropylS complex with Ru(III) seems to be, in our opinion, a good candidate for further research including the complex synthesis and the comparative analysis of physicochemical properties and biological activity compared to the unbound ligand.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Polish National Science Centre (NCN) under Grant No. UMO-2019/33/B/ST4/00031.

#### Authors contribution statement

The manuscript was written through the contributions of all authors. All authors have approved the final version of the manuscript.

A. Ciesielska performing experiments (synthesis, chloride content determination, electrochemical profile, acid-base properties, complexation ability), writing introduction part of the original draft; M. Gawrońska: performing synthesis, writing a part of the original draft regarding the synthesis of the compound; M. Makowski conceptualization, supervision, funds acquisition, writing – review & editing; S. Ramotowska conceptualization in parts of electrochemical measurements and determination of  $pK_a$  values, methodology in electrochemical and acid-base titration parts, writing a part of the original draft regarding the electrochemical, acid-base and complexing properties.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.115868>.

#### References

- [1] C. Pérez, C.V. Díaz-García, A. Agudo-López, V. del Solar, E. Cabero, M.T. Aguiló-Utreras, C. Navarro-Ramírez, J. Alonso, J.A. López-Martin, Evaluation of novel trans-sulfonamide platinum complexes against tumor cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* 76 (2014) 360–368.
- [2] H.G. Acha, S. Osora, N. Karszen, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of acetylacetylhydrazone platinum(II) complexes with Nickel(II), Palladium(II), Platinum(II), Copper(II), Cobalt(II) complexes. *Inorg. Chem. Commun.* 14 (2011) 1550–1553, <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2011.05.024>.
- [3] U.D. Ozdenik, N. Ozbek, E.K. Gene, F. Iltiz, A.B. Güldürüplü, New bisaristic silver (I) complexes: synthesis, characterization, antitumor, anti-acetate and anti-carbonic anhydrase II activities. *J. Mol. Struct.* 1130 (2017) 55–63, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.02.191>.
- [4] C.R. Muzak, S.T. Stefanello, V. da Costa Flores, V.A. Agostini, P.C. Benez, G.O. Rossi, T.C. da Silva, F.A. Acunarse Soares, L. de Lourenço Marques, M.M.A. de Campos, The antibacterial and anti-biofilm activity of gold-complexed sulfonamides against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb. Pathog.* 123 (2018) 440–448.
- [5] L. Peng, W. Zou, Y. Zhang, Sulfonamides escape cell division in the host apical meristem by inhibiting fucose synthesis. *J. Hazard. Mater. Adv.* 5 (2022) 100043.
- [6] Y. Wan, G. Fang, H. Chen, X. Deng, Z. Tang, Sulfonamide derivatives as potential anti-cancer agents and their SARs elucidation. *Eur. J. Med. Chem.* 226 (2021). 113837, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113837>.
- [7] Z. Guo, Y. Xu, Y. Peng, Haxiao or Radisl, W. Qian, P. Xie, L. Wu, J. Jiang, L. Wang, X. Li, Design, synthesis and evaluation of novel (R)-cysteine derivatives containing an aryl group and an aryl sulfonamide unit as anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 29 (9) (2019) 1133–1137.
- [8] F. Xu, F. Min, J. Wang, Y. Liu, S. Huang, M. Chen, B. Wu, Y. Zhang, Development and evaluation of a Lumazine ATAG assay for sulfonamide resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates. *Mol. Cell. Probes* 49 (2020) 101476.
- [9] T. Tripala, A. Pavanal-Abramo, M.A. Mendes-Talim, A. Bodali, A. Cauteranos, J. Torres, C. del Pozo, J. Borras, G. Alcazar-Pina, New sulfonamide complexes with essential metal ions [Cu (II), Co (II), Ni (II) and Zn (II)]. Effect of the geometry and the metal ion on DNA binding and nuclease activity. SEA protein interaction. *J. Inorg. Biochem.* 202 (2020) 110023.
- [10] V.R. Sobczani, S.Y. Yun, D. Lee, Structure and reactivity of sulfonamide- and acetate-chelated ruthenium allylidene complex. *Org. Chem. Front.* 3 (2016) 939–943, <https://doi.org/10.1039/C5QO00614C>.
- [11] M. Mandelli, F. Pavani, P.C. de Souza, C.Q. Leite, J. Elkam, O.B. Nascimento, C. Fiorillo, B.H. Tassin, Study of a series of cobalt(II) sulfonamide complexes: Synthesis, spectroscopic characterization, and microbiological evaluation against *M. tuberculosis*. Crystal structure of [Co(sulfamonomethoxyl)2(H2O)2]H2O. *J. Mol. Struct.* 1036 (2013) 180–187.
- [12] P. Spina, A. Chylewska, A. Kozłowa, S. Ramotowska, A. Dąbrowska, M. Makowski, Stimulation of sulfonamides antibacterial drug activity as a result of complexation with ruthenium: physicochemical and biological study. *Int. J. Med. Sci.* 22 (2021) 13482, <https://doi.org/10.1096/ijms22413482>.
- [13] I. Zuba, M. Zuba, M. Piotrowski, A. Pawlikojo, Ruthenium as an important element in nuclear energy and cancer treatment. *Appl. Radiat. Isot.* 162 (2020) 109176, <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2020.109176>.
- [14] J. Shen, T.W. Rees, L. Ji, H. Zhao, Recent advances in ruthenium(II) and iridium(III) complexes containing nanosystems for cancer treatment and bioimaging. *Coord. Chem. Rev.* 443 (2021) 214016, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214016>.
- [15] Praggi, B.E. Kandi, S. Mahalingam, Target based chemotherapeutic advancement of ruthenium complexes. *Coord. Chem. Rev.* 448 (2021) 214165.
- [16] X. Zhang, D. Liu, F. Lv, B. Yu, Y. Shan, H. Cong, Recent advances in ruthenium and platinum based supramolecular coordination complexes for antitumor therapy.

- Colloids Surf., B 182 (2019), 110373, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110373>.
- [17] D. Chen, B. Guo, X. Tang, Y.J. Peng, H. Bi, H. Shen, Z. Zhou, A. Qian, J. Shen, J. Wang, Combination of ruthenium (II) polypyridyl complex 3-Ru1 and Tavel enhances the anti-tumor effect on Temozolomide resistant cells through Gsptase-1/55DMD-mediated pyroptosis, *J. Inorg. Biochem.* 200 (2022) 111749.
- [18] A. P. Amora, M.E. Cucullotta, F. Immini, G. Morelli, R. Palmieri, F. Ruffa, D. Tassano, Pyridine Ruthenium(II) complexes entrapped in liposomes with enhanced cytotoxic properties in PC-9 prostate cancer cells, *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 91 (2019) 352–358.
- [19] S. Koczhanovskij, P.R. Fronczek, V. Mahalingam, Ruthenium(II) hydroxo-oxo complexes with triphenylphosphine/terphenylamine co-ligands: synthesis, DNA/BSA binding, antitumor and cytotoxic activity, *Inorg. Chim. Acta* 506 (2021), 120532, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2021.120532>.
- [20] W.D. Guearn, H.J. Sanyal, H.H. Kopschger, E. Odella, G.D. Schöler, T.A. Moore, R. E. Yasvies, A.L. Moore, 5-(II)-Naphthoquinone complex as a platform for photocatalytic activity, *J. Photochem. Photobiol. A* (2022) 109998.
- [21] S. Bhakki, Y. Wang, F. ur Rehman, H. Jiang, X. Wang, Fluorescent Ir(III) complexes as cellular staining agents for biomedical molecular imaging, *Coord. Chem. Rev.* 416 (2020) 213844.
- [22] K. Kalyanasundaram, S.M. Zakeeruddin, M.K. Nazareuddin, Ligand to metal charge transfer transition in Ru(II) and Os(II) complexes of substituted 2,2'-bipyridines, *Coord. Chem. Rev.* 132 (1994) 259–264, [https://doi.org/10.1016/0010-8545\(94\)80499-6](https://doi.org/10.1016/0010-8545(94)80499-6).
- [23] B. Liu, N. Roy, S. Patai, P. Mohanrao, P. Prasad, Ruthenium and iridium based mononuclear and multinuclear complexes: A Breakthrough of Next-Generation anticancer metallopharmaceuticals, *Inorg. Chim. Acta* 512 (2020), 119858, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119858>.
- [24] A. Chylewska, D. Jacewicz, D. Zareczanska, L. Chmurnyńska, Determination of formation constants for coordination compounds of Cr(III) and Co(III) using potentiometric and spectrophotometric methods, *J. Chem. Thermodyn.* 40 (2008) 1290–1294, <https://doi.org/10.1016/j.jct.2008.03.012>.
- [25] E. Moreno-Viguri, S. Pérez-Silanes, Quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives: interest in the treatment of diagan disease, *Revista Virtual de Química* 5 (2013), <https://doi.org/10.5935/1904-0035.20130000>.
- [26] E. Moreno, S. Pérez-Silanes, S. Guzmán-Gómez, A. Martínez, S. Ancón, E. Torres, I. Alfaro, A. Murga, F.W. Czarny, 1,4-Di-N-oxide quinoxaline-2-carboxamide: Cyclic voltammetry and relationship between electrochemical behavior, structure and anti-tubercular activity, *Electrochim. Acta* 56 (9) (2011) 3270–3275.
- [27] A. Ciszewski, F. Armijo, M.A. Del Valle, R.A. Tapia, C. Theodores, C.D. Peraza, et al., Biological activities and correlations tendency of electrochemical properties of some indolizino [1,2-b]quinoxaline derivatives, *J. Chil. Chem. Soc.* 57 (2012) 1126–1129, <https://doi.org/10.4067/S0717-97072012000200015>.
- [28] M. Mulecka, A. Słoczyńska, D.M. Goodman, C.G. Hartings, E. Budzisz, Biological properties of ruthenium(II)/(III) complexes with flavonoids as ligands, *Coord. Chem. Rev.* 436 (2021), 213849, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213849>.
- [29] I. Kostova, Ruthenium complexes as anticancer agents, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 1085–1107, <https://doi.org/10.2174/0920007067767636094>.
- [30] J. Wiśniewska, M. Fandłoch, I. Laksenka, The reduction of ruthenium(III) complexes with thiazolopyrimidine ligands by ascorbic acid and mechanistic insight into their action in anticancer therapy, *Inorg. Chim. Acta* 484 (2019) 305–310, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.09.051>.
- [31] S. Kozłowska, A. Ciesielska, M. Makowski, What can electrochemical methods offer in determining DNA-Drug interactions? *Molecules* 26 (2021) 3478, <https://doi.org/10.3390/molecules26113478>.
- [32] M. Kowalik, J. Berezki, M. Górnowska, K. Kamierczuk, M. Makowski, Experimental and theoretical investigation of conformational states and noncovalent interactions in crystalline sulfonamides with a methoxyphenyl moiety, *CrystEngComm* 23 (2021) 6137–6162, <https://doi.org/10.1039/D1CE00069B>.
- [33] D. Zareczanska, S. Rasmotowska, A. Wciol, I. Dąbkowska, P. Niedziałkowski, T. Ogiński, In pursuit of the Metal chelationophores (part II): pH-spectrophotometric characteristics of *trans*-1,2-*cis*-4-ethers substituted with an anthraquinone moiety, *Dyes Pigm.* 130 (2016) 273–281, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.03.014>.
- [34] T. Ogiński, M.O.F. Guedes, F.C.d. Alves, A.E.G. Sina, P.R.B. Miranda, C.d. O. Costa, A. Livo, P. Palibowski, D. Zareczanska, Determination of the pKa values of some biologically active and inactive hydroxyquinones, *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (1) (2008) 173–183.
- [35] W. Schif, B. Kuzniński, A. Sady Chwałczewska, S. Kulodziej, E. Górn, D. Zareczanska, A. Wciol, T. Ogiński, Structure investigation of intramolecular hydrogen bond in some substituted ethylphenylhydroxy and 4-aminocyantrine derivatives in solution and in the solid state, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 108 (2013) 47–54.
- [36] J. Kozłowski, A. Livo, Determination of equilibrium parameters by minimization of an extended sum of squares, *Talanta* 37 (1990) 645–650, [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(90\)90311-W](https://doi.org/10.1016/0039-9140(90)90311-W).
- [37] J. Kozłowski, A. Livo, A general method for the determination of the stoichiometry of unknown species in multicomponent systems from physicochemical measurements, *Comput. Chem. (Oxford)* 11 (1987) 195–210, [https://doi.org/10.1016/0097-4858\(87\)90016-9](https://doi.org/10.1016/0097-4858(87)90016-9).
- [38] A. Chylewska, A.M. Dąbrowska, S. Rasmotowska, N. Moczajewska, M. Olszewski, M. Bogdzki, et al., Photosensitive and pH-dependent activity of pyrene-functionalized calixarene derivative as promising antifungal and imaging agent, *Sci Rep* 10 (2020) 11767, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68736-6>.
- [39] P.S. Guin, S. Das, P.C. Mandal, Electrochemical reduction of quinones in different media: a review, *Int. J. Electrochem.* 2011 (2011) 1–22.
- [40] L. Yang, J.S. Durdick, S. Gurle, Hydration of enzyme in aqueous media is consistent with solvent dependence of its activity, *Biophys. J.* 87 (2004) 813–821, <https://doi.org/10.1529/biophysj.104-041205>.
- [41] J.E. Partanen, Calculation of the first and second stoichiometric dissociation constants of glycine in aqueous sodium chloride solutions at 298.15 K, *Beichte der Bundesanstalt für physikalische Chemie* 102 (1998) 855–865, <https://doi.org/10.1002/bkpc.199810201>.
- [42] S. Jędrak, V. Altun, N. Jędrak, G. Alkanak, J.L. Baltan, Solvent effects on pKa values of some substituted sulfonamides in acetonitrile–water binary mixtures by the UV-spectroscopy method, *J. Chem. Eng. Data* 54 (2009) 3014–3021, <https://doi.org/10.1021/je900081a>.
- [43] G. Volgyi, R. Ruiz, K. Box, J. Camar, E. Souch, K. Takacs-Novak, Potentiometric and spectrophotometric pKa determination of water-insoluble compounds: Validation study in a new cosolvent system, *Anal. Chim. Acta* 583 (2) (2007) 416–420.
- [44] Z. Qiang, C. Adams, Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics, *Water Res.* 38 (2004) 2874–2890, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.017>.
- [45] W.M. Honey, Synthesis and Equilibrium Studies of the Metal Complexes of 4-Amino-N-(2,6-dimethyl-pyrimidin-2-yl)-benzenesulfonamide (Sulphadiazine), *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.* 27 (1997) 197–226, <https://doi.org/10.1080/00945719708000136>.
- [46] A.M. Mansour, Molecular structure and spectroscopic properties of novel manganese(II) complex with sulfamethoxazole drug, *J. Mol. Struct.* 1035 (2013) 114–125, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.09.048>.
- [47] S. Shoaib Ahmad Shah, M. Ashraf, T. Najam, M. Mehboub Abusad, G. Shrivastava, B. Tabassum, et al., Synthesis of sulfonamides metal complexes and the study of in vitro biological activities, *Curr. Biomater.* 9 (2013) 211–220.
- [48] P.C. Boech, V.A. Agosti, G.O. Rossi, F. dos Santos Siqueira, J.D. Siqueira, L. I. Marques, G.N.M. de Oliveira, R.C.V. Santos, M.M.A. de Campos, Sulfonamides complexed with metals as mycobacterial biofilms inhibitors, *J. Clin. Tubercul. Other Mycobacterial Diseases* 23 (2021) 100217.
- [49] M.S. Refat, T. Shorshar, K.M. Elshahawi, M.Y. El-Sayed, A.M.A. Adam, Synthesis, physico-chemical characterization and anticancer screening of sulfonamide ruthenium complexes as anticancer agent, *J. Mol. Liq.* 222 (2016) 334–349, <https://doi.org/10.1016/j.jml.2016.07.006>.
- [50] A.C. Haugua, G. Bacci, R.L. Souza, E. Pall, M. Cesaris, L.S. Opexan, B. Resente, Synthesis, crystal structure, DNA cleavage and antitumor activity of two copper(II) complexes with N-sulfonamide ligand, *Inorg. Chim. Acta* 483 (2018) 884–893.
- [51] E.S. Antonarakis, A. Emadi, Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66 (2010) 1–9, <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1293-1>.
- [52] S.R. Goerzried, F. Kapina, C.M. Gallati, A. Njimi, M. Czapczyni, M. Heumann, et al., Investigations of the reactivity, stability and biological activity of halido (NHC) gold(I) complexes, *Dalton Trans.* 51 (2022) 1395–1406, <https://doi.org/10.1039/D1DT03520B>.
- [53] X. Li, K. Heimann, F. Li, J.M. Warner, F.R. Keene, J.G. Collins, Dinuclear ruthenium (II) complexes containing one inert metal centre and one coordinatively-labile metal centre: synthesis and biological activities, *Dalton Trans.* 49 (2010) 4017–4020, <https://doi.org/10.1039/C9DT94888E>.
- [54] A. Mishra, B. Kumar, A. Khanolkar, P. Laxmi, M. Chakravarti, R.K. Mishra, Hemi labile intramolecular N → Sn coordination in a dinuclear (IV) sulfide [R2Sn(μ-S)]2 (R = 2-phenylthioethyl) complex: synthesis, structure, DFT-NBO and antibacterial studies, *Polyhedron* 205 (2021), 115302, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2021.115302>.

## Application of the SwitchSense Technique for the Study of Small Molecules' (Ethidium Bromide and Selected Sulfonamide Derivatives) Affinity to DNA in Real Time

Sandra Ramotowska,<sup>#</sup> Paulina Spisz,<sup>#</sup> Jakub Brzeski, Aleksandra Ciesielska, and Mariusz Makowski<sup>#</sup>

Cite This: *J. Phys. Chem. B* 2022, 126, 7238–7251

Read Online

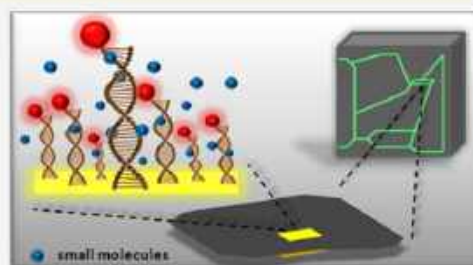
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** The discovery and introduction of the switchSense technique in the chemical laboratory have drawn well-deserved interest owing to its wide range of applications. Namely, it can be used to determine the diameter of proteins, alterations in their tertiary structures (folding), and many other conformational changes that are important from a biological point of view. The essence of this technique is based on its ability to study of the interactions between an analyte and a ligand in real time (in a buffer flow). Its simplicity, on the other hand, is based on the use of a signaling system that provides information about the ongoing interactions based on the changes in the fluorescence intensity. This technique can be extremely advantageous in the study of new pharmaceuticals. The design of compounds with biological activity, as well as the determination of their molecular targets and modes of interactions, is crucial in the search for new drugs and the fight against drug resistance. This article presents another possible application of the switchSense technique for the study of the binding kinetics of small model molecules such as ethidium bromide (EB) and selected sulfonamide derivatives with DNA in the static and dynamic modes at three different temperatures (15, 25, and 37 °C) each. The experimental results remain in very good agreement with the molecular dynamics docking ones. These physicochemical insights and applications obtained from the switchSense technique allow for the design of an effective strategy for molecular interaction assessments of small but pharmaceutically important molecules with DNA.



### INTRODUCTION

Why is the search for new, effective methods of studying the interactions of compounds with potential pharmacological applications with DNA so crucial? Each cell in the human body contains one molecule of genomic DNA and various proteins in numerous copies. Through the genetic information collected in the DNA, a damaged protein can be biosynthesized. On the other hand, DNA damage beyond repair capacity leads to cell death. This is why DNA is a target of many therapies and why it is so important to study the interaction of potential pharmaceuticals with this biomolecule. Scientists from all over the world seek new tools and applications of accessible methods for the precise description of physicochemical and biological phenomena. One of these tools may be the recently developed technique called switchSense.<sup>1–5</sup> This technology uses chips with an electrically switchable gold surface covered with DNA nanolevers, which enables the characterization of intermolecular interactions in real time (Figure 1). The single nanolever consists of an anchor strand that is covalently attached to a chip surface and an adapter strand terminated with a fluorescence dye. The sequence binds to the anchor strand due to complementarity. The sequences are specially

selected to create a stable double strand even up to 80 °C. The last component is a ligand strand that can bind different types of ligands. To extend the chips' lifetime and increase the possibility of their functionalization, they have been adopted to be regenerable and thus reusable. This also allows for the reduction of the cost of the measurements, which is of utmost importance while working with biologically active compounds.

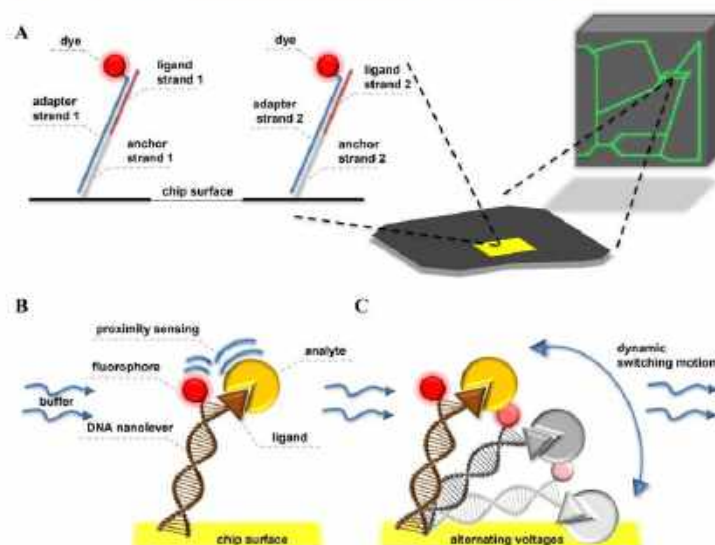
The switchSense combines sensitive kinetic research with structural information, such as the shape, size, and conformation of biomolecules, enabling the understanding of interactions at a molecular level. Dedicated electronics manage the electric actuation of fluorescently labeled DNA nanolevers placed on the biochip surface using the phenomenon of electrically triggered time-correlated single-photon counting (E-TCSPC). The nanolevers are introduced into a controlled

Received: May 6, 2022

Revised: September 5, 2022

Published: September 15, 2022





**Figure 1.** Principle of the helix (Dynamic Biosensors) apparatus. (A) Scheme of the modified chip surface. Schematic presentation of the measurement system in (B) static mode and (C) dynamic mode.

movement by changing the voltage on the surface of the gold electrodes. When the interaction occurs, nanoprobe oscillations and/or dye fluorescence change, which are then used to determine the number of kinetic and biophysical parameters. To obtain data on molecular interactions, the apparatus combines automatic fluid distribution, measurement mode control (static or dynamic), temperature control, chip management, and the introduction of numerous modifications to the nanolever system. Moreover, using the microfluidics system, low sample consumption and biochip regeneration make the switchSense technique economical and environmentally friendly, which is in agreement with "The 12 Principles of Green Chemistry".<sup>6</sup>

SwitchSense has been successfully used to determine numerous physicochemical properties and quantities such as diameters of proteins, protein folding, and conformational changes.<sup>7</sup> Its applicability can also be extended to study the enzyme activity and the influence of ions on nucleic acid folding, analyze the monomeric and trimeric states of TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), and detect carcinogenic water pollutants.<sup>8–11</sup> Furthermore, it has proven useful and effective in obtaining the binding and dissociation kinetic parameters of molecules such as proteins or polyamides to nucleic acids,<sup>8,12–15</sup> and interactions of small molecules with the human serum albumin.<sup>16</sup>

Based on the fact that DNA acts as a molecular target for many of the pharmaceuticals used in a variety of therapies, e.g., anticancer treatment, extending the application of switchSense seems to be desirable. This technique allows the assessment of both association and dissociation processes for ligand–analyte interactions. The determination of the binding strength is one of the factors that provide a solid justification for further research, including biological study. Our group has recently started working on adapting this technique for the study of the

mechanism and strength of binding of small molecules directly to the DNA chain. The preliminary studies were performed with a well-known DNA intercalator: ethidium bromide (EB, a model molecule). The EB is described by a high value of the binding constant to the DNA, and its thermodynamic characteristic of binding to the said biomolecule has been well described in other types of experiments.<sup>17–21</sup> The sulfonamides have been selected as the main research object due to their proven antibiotic and anticancer properties.<sup>22–27</sup> Therefore, the second small compound that has been selected for the research was sulfathiazole (STZ), a chemotherapeutic agent with a strong bacteriostatic effect. Its interaction with DNA in solutions was proven by our group using spectrophotometric titration.<sup>28</sup> It was previously confirmed that STZ was also a promising ligand for the formation of complexes with transition metal ions (e.g., Ru(III)) and that the complexation improved its antimicrobial and anticancer properties.<sup>28</sup> As for further research objects, two sulfonamide derivatives differing in the alkylamino substituent length, 4-amino-*N*-(2-aminoethyl)benzenesulfonamide (NethylS) and 4-amino-*N*-(3-aminopropyl)benzenesulfonamide (NpropylS), were selected. The physicochemical and complex forming properties of said compounds were recently determined by our group.<sup>29</sup>

Understanding the mechanism of DNA–drug interactions is crucial in the drug design process as well as in biological activity studies. A combination of both innovative experimental technique and well-known computational methods to determine the binding mode and strength of the interaction of small molecules to the DNA chain was used in the present paper. Such an approach might prove extremely important as both primary and complementary analytical tools for rather costly and time-consuming *in vivo* studies. Therefore, in this paper, we (i) present a never reported route of obtaining the

optimal methodology for studying the kinetics of binding of small molecule compounds to DNA using the switchSense technique; (ii) describe the affinity of studied sulfonamides to a selected DNA double-strand sequence by determining parameters such as the association/dissociation rate and binding constant for the sulfonamide–DNA adduct; and (iii) discuss the possible mode and binding sites of studied sulfonamides to the particular base pair sequence used in this study. Our results are promising, and the technique has the potential of becoming a powerful tool for the study of the affinity of pharmaceuticals to biomolecules in real time. We do believe that this innovative use of switchSense technology would facilitate the research on biologically active compounds targeting nucleic acid.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Samples and Measurements.** The ethidium bromide and sulfathiazole were purchased from Sigma Aldrich. The NethylS and NpropylS were synthesized previously by our group. The synthesis pathway for the NethylS and NpropylS procedure was described elsewhere.<sup>29</sup> All buffers and solutions (PE40 buffer  $\times 10$ , regeneration, passivation  $\times 10$ , EDTA, chip, and standby solutions) together with 96-well plates and 1.3 and 10.0 mL autosampler vials with caps dedicated to the helix instrument were delivered by Dynamic Biosensors GmbH (Planegg, Germany). The buffers and solutions requiring dilution were prepared from double-distilled and additionally filtered (2  $\mu\text{m}$ ) water. The analyte (EB, STZ, NethylS, and NpropylS) solutions were prepared and measured in several concentrations, i.e., the ethidium bromide from  $10^{-6}$  to  $10^{-9}$  M (dilution factors 10 and 2), the sulfathiazole from  $1 \times 10^{-4}$  to  $1.25 \times 10^{-5}$  M (dilution factor 2), the NethylS from  $2 \times 10^{-4}$  to  $2.5 \times 10^{-5}$  M (dilution factor 2), and NpropylS from  $8 \times 10^{-4}$  to  $1 \times 10^{-4}$  M (dilution factor 2). The EB samples were prepared using the PE140 buffer (pH 7.4; 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 140 mM NaCl, 0.05% Tween20, 50  $\mu\text{M}$  EDTA, 50  $\mu\text{M}$  EGTA) and also using the PE40 buffer (pH 7.4; 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 40 mM NaCl, 0.05% Tween20, 50  $\mu\text{M}$  EDTA, 50  $\mu\text{M}$  EGTA), while for sulfonamides, the PE40 buffer was used. To reduce the evaporation of samples during the measurement, the plates were sealed.

**The Measuring System.** The measuring system is made of a DNA probe terminated with a fluorophore (red, dye A) immobilized on the gold biosurface of the chip (standard adapter, Helix-ADP-2-0). The DNA fragment is a 96 bp (base-pair) sequence where both the adapter (5'-48 bases + TAG TGC TGT AGG AGA ATA TAC GGG CTG CTC GTG TTG ACA AGT ACT GAT-3') and ligand-free strands (5'-ATC AGT ACT TGT CAA CAC GAG CAG CCC GTA TAT TCT CCT ACA GCA CTA-3') are distinguished. The first 48 bp is internal company secret information. The strands were provided by the manufacturer in a prehybridized form as chip and standby solutions. The measurement system was the same on spots 1 and 2.

**Dynamic and Static Modes of Measurements.** The experiments were performed using two modes: dynamic and static. In the first of them, there was a need to use the stepwise measurement approach, while in the static mode, the experiments were performed using the methods provided by manufacturers (Standard Kinetics v46, weak binder kinetics). The first step of all experiments was functionalization. The adapter concentration was  $1 \times 10^{-7}$  M, and the time of this process was 200 s. The proper kinetics analysis was our next

step. Depending on the selected mode and method, the association and dissociation times differed as follows: (i) in the dynamic mode and for the weak binder method, these were equal to 30 and 60 s, respectively, (ii) while in the static mode and for the standard method, these were equal to 60 and 300 s, respectively. The flow rate in all cases was 200  $\mu\text{L}/\text{s}$ . The dissociation process was carried out until the analyte was completely washed out of the system by the buffer. The LED (light-emitting diode) power was 2. The analysis was performed for the five concentration variants, namely, 0 (blank) and the remaining four (listed above) depending on the tested compound. The blank was performed before and after a series of concentrations. The analyses were performed in either the PE140 or PE40 buffer; these buffers differ in NaCl concentration and hence ionic strength. All of these parameters were chosen based on optimization. The measurements in the various flow rates, in the range of 50 to 500  $\mu\text{L}/\text{s}$ , and time variants of the dissociation and association process have been performed.

All variants of measurements have been registered at three temperatures: 15, 25, and 37  $^\circ\text{C}$ . To check the status and parameters of the used chips, a chip test procedure was performed before and after the measurement. The chip tests were carried out using the method provided by the manufacturers (v3) with an inflection point of 0.15 and a temperature of 25  $^\circ\text{C}$ .

**Result Analysis.** The results were analyzed using the Helix software (v1.7.0). All curves of response as fluorescence change during the dissociation and association processes as one data set (data for five different concentrations) were fitted with the 1:1 interaction model expressed by eqs 1 and 2, respectively.

$$y = A(1 - e^{-(k_a c + k_d)(t - t_0)}) + y_0 \quad (1)$$

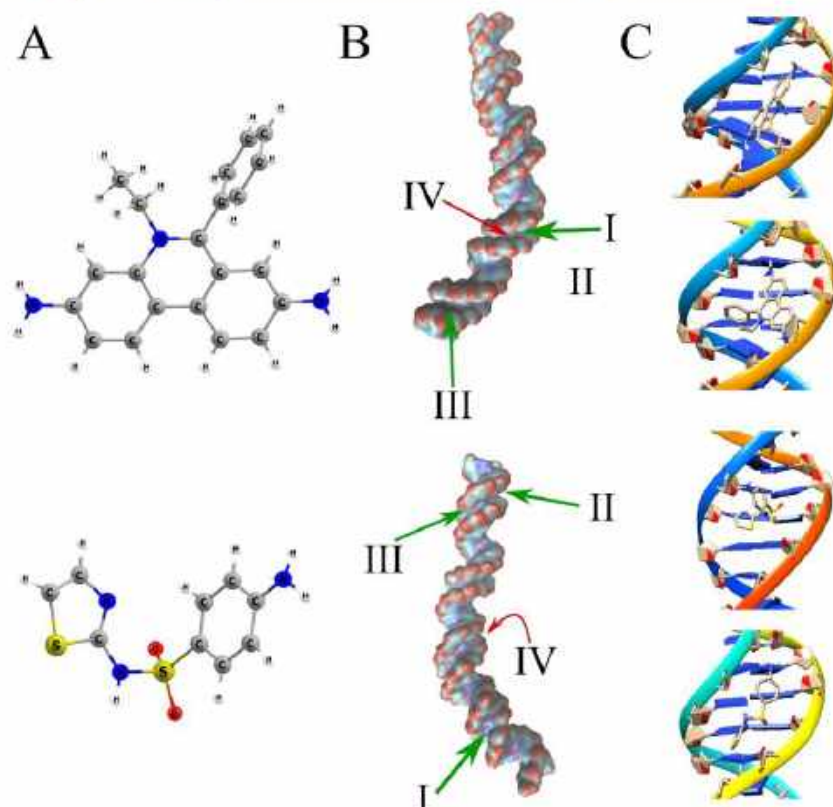
$$y = A(1 - e^{-k_d(t - t_0)}) + y_0 \quad (2)$$

where  $A$  is a signal amplitude;  $t_0$  and  $t_1$  are start times assigned to the association and dissociation processes, respectively;  $y_0$  is a baseline;  $c$  is a concentration;  $k_a$  and  $k_d$  are association and dissociation rates, respectively. Considering eqs 1 and 2, the association constant ( $K_A$ ) could be calculated following eq 3 at the equilibrium:

$$K_A = \frac{k_a}{k_d} \quad (3)$$

**Computational Methods.** The equilibrium structures of all analytes (EB and sulfonamides) were obtained by geometry optimizations employing the wB97XD<sup>30</sup> hybrid-functional including empirical dispersion and the 6-311++G(2d,2p) Pople-type basis set.<sup>31</sup> Force constants and vibrational frequencies were then calculated to ensure that optimized structures are true minima on the potential energy surface. The aqueous environment ( $\epsilon = 78.3553$ ) of the solution was approximated by employing the CPCM<sup>32</sup> solvation model in all the above-mentioned calculations. The Cartesian coordinates of the equilibrium structures of all compounds considered here are collected in Table S1. All quantum chemical calculations were carried out using the GAUSSIAN16 (Revision C.01)<sup>33</sup> computational package.

Because the experimental structure of the DNA helix used in this work is not well-known and the only data on the structure is its sequence, the Nucleic Acid Builder (NAB)<sup>34</sup> was used to



**Figure 2.** The results of theoretical calculations for ethidium (top) and sulfathiazole (bottom). (A) Equilibrium structures of *ab initio* optimized ethidium and sulfathiazole. (B) The positions of the most common binding sites (green) and the sites characterized by the highest value of analyte–receptor binding energy (red). The thickness of each arrow represents the relative abundance of a given clustering. The presented isosurface was obtained from the Gaussian density map as implemented in VMD.<sup>39</sup> (C) The most popular (top) and most strongly bonded (bottom) conformation of an analyte–receptor complex from docking simulations focused on the most important grooves.

build an initial structure for further calculations. The B-type conformation of the DNA was assumed at this step, as it is the most abundant in cells.<sup>35</sup> In the next step, the OL15 force field<sup>36</sup> was used to obtain the initial parameters (topology and coordinates) for MD simulations. The DNA double helix was solvated with 95,963 TIP3P model<sup>37</sup> water molecules and placed in a truncated octahedral periodic box with an edge length of 157 Å and a minimum distance between the solute and the box equal to 5 Å. Subsequently, the system was neutralized with Na<sup>+</sup> counterions to reproduce the physiological conditions and keep the solute molecules within the simulation box. Overall, the whole system contained 291,031 atoms. The energy minimization was carried out in two steps: (i) first with 1500 steepest descent cycles and 1000 conjugate gradient cycles with the 50 kcal/mol·Å<sup>-2</sup> weight for the positional restraints on the solute, without H atoms, which were allowed to relax, and (ii) second with 6000 steepest descent cycles and 3000 conjugate gradient cycles without restraints. Later, the system was heated up to 298 K for 10 ps with the same restraints as in the second step of the

minimization and equilibrated for 50 ps at 298 K with a constant pressure of 1 bar in an isothermal isobaric ensemble (NPT; N: number of particles, P: pressure, and T: temperature were kept constant). Finally, after heating, the molecular dynamic simulations (MD) were then run for 10 ns in an NPT ensemble with the PME (particle mesh Ewald method<sup>38</sup>) and SHAKE algorithm.<sup>39</sup> The geometry of the solute obtained by averaging over structural ensembles from the last 1 ns of the production step of MD was taken for the molecular docking simulations. During this step, the collision frequency was set to 1 ps<sup>-1</sup>, whereas the cutoff for nonbonded interactions was set to 8 Å. All MD calculations were performed using the AMBER14 package.<sup>40</sup>

Molecular docking simulations were performed using AutoDock 4.2 Release 4.2.6.<sup>41</sup> The structures of analytes and the receptor (DNA) without nonpolar hydrogen atoms were used. For said structures, the Gasteiger partial charges<sup>42</sup> were calculated and then used in the docking simulations. The binding of analytes to the DNA helix was performed using the Genetic Algorithm. Because receptor binding sites were

unknown, it was necessary to carry out docking simulations in two manners. First, less accurate docking was performed with a large grid box ( $96 \times 126 \times 54 \text{ \AA}^3$ ) and  $1 \text{ \AA}$  grid point spacing, including the whole DNA strand to locate the most favorable binding sites. Subsequently, more accurate docking simulations with grid boxes covering only the most important binding sites with  $0.303 \text{ \AA}$  grid point spacing were carried out to obtain more rigorous and exact results. The analyte–receptor interaction Gibbs free energy ( $\Delta G$ ) was evaluated according to eq 4:

$$\Delta G = (V_{(\text{bound})}^{A-A} - V_{(\text{unbound})}^{A-A}) + (V_{(\text{bound})}^{R-R} - V_{(\text{unbound})}^{R-R}) + (V_{(\text{bound})}^{R-A} - V_{(\text{unbound})}^{R-A}) + \Delta S_{\text{conf}} \quad (4)$$

where A refers to the “analyte” and R to the “receptor” in a docking calculation. The pairwise energy terms ( $V$ ) include evaluations of hydrogen bonding, electrostatics, dispersion/repulsion, and desolvation. The exact form of  $V$  can be found in the AutoDock 4.2 manual. As can be seen from the above equation, both pairwise evaluations and the conformational entropy ( $\Delta S_{\text{conf}}$ ) lost upon binding are taken into account in the assessment.

## RESULTS AND DISCUSSION

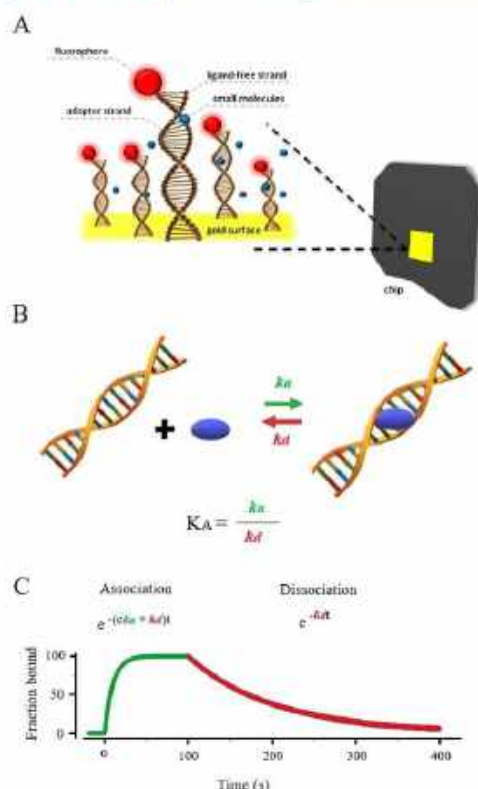
**Optimization Based on Ethidium Bromide Interactions with DNA.** The results of theoretical calculations for ethidium bromide interactions with DNA are depicted on Figure 2. The equilibrium structures of *ab initio* optimized compounds and the positions of the most common (green) and most strongly bonded (red) binding sites together with the results of high-accuracy ( $0.303 \text{ \AA}$  grid point spacing) docking simulations are illustrated in the figure.

Ethidium bromide (EB; Figure 2A) can intercalate into a DNA duplex from the minor groove, which results in a reduction of the  $36^\circ$  twist to  $10^\circ$ , and hence, the DNA unwinds by  $26^\circ$ .<sup>21,43–45</sup> As previously reported, the EB preferably intercalates in GC-rich sequences;<sup>46</sup> however, there are also reports indicating its intercalation in AT base pairs.<sup>47</sup> Intercalation has been generally considered to be the result of a hydrophobic interaction in which an aromatic molecule is drawn to a nonpolar environment of the base pairs from the hydrophilic aqueous surroundings.<sup>48</sup> Moreover, computational studies with the ethidium bromide suggested that its intercalation complexes are also stabilized by frontier orbital interactions between the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) of the intercalator and the highest unoccupied molecular orbital (HOMO) of the adjacent purine bases.<sup>49</sup> As can be seen from Figure 2B, the most preferable docking sites for ethidium are located in the bottom part of the studied DNA helix, i.e., the part closer to the anchor. Namely, both the most popular docking site (I) and the one within which analyte binds the strongest (IV) are located in the same minor groove, i.e., the second one counting from the anchored end of the double helix. The aforesaid groove is dominated by the presence of AT base pairs, which indicates a high affinity of ethidium to these two nucleobases. For the strongest bonded mode (IV), the corresponding binding energies are in the range of  $4.28$ – $5.52 \text{ kcal/mol}$  depending on the conformation of ethidium relative to the receptor. The situation is quite different when the results of more accurate, second minor groove-focused calculations are considered. Over 90% of all dockings found exhibit binding energy over  $5.5 \text{ kcal/mol}$ . The

most popular (top) and the strongest bonded (bottom) conformation of an analyte–ligand complex from docking simulations focused on the most important grooves. In the most popular bonding mode, for which the bonding energy was calculated to be equal to  $6.87 \text{ kcal/mol}$ , the ethidium is oriented perpendicularly to the minor groove. On the other hand, in the case of the complex bonded by the highest value of  $7.97 \text{ kcal/mol}$ , the molecule is oriented in a way that allows its rings to somewhat clasp one of the nucleobase pairs forming the groove, like tongs. Both the affinities of ethidium to the AT base pair and to minor groove binding overall are of no surprise as such binding modes were observed elsewhere,<sup>45,47</sup> which validate the molecular docking results reported in this paper. The two remaining most popular binding sites were calculated to be placed within the first minor groove, which is not dominated by any particular base pairs as the anchored end of the helix starts with the TAG TGC sequence.

The computational methods were used to obtain the information on which parts of the examined fragment of the DNA helix the EB molecule most preferably attaches to. The aforesaid data also indicated the binding mode, which could be further characterized by the strength of interaction and compared with the experimental value of the association constant  $K_A$ . High values of  $K_A$  (binding constant, approx.  $10^4$ – $10^6 \text{ M}^{-1}$ ) imply intercalation. The association constants for the DNA–EB adduct known in the literature differ slightly in their values from each other, depending on the measurement technique used,<sup>19,21,51</sup> and are equal to about  $10^5$ – $10^6 \text{ M}^{-1}$ . The switchSense technique enables the description of both the association and dissociation processes occurring during the flow of the analyte by kinetic rate constants  $k_a$  (eq 1) and  $k_d$  (eq 2) and, on their basis, the determination of the association constant expressed in the form of  $K_A$  (eq 3). The curve showing the processes of association and dissociation of the analyte to the ligand system (which is a fragment of double-stranded DNA) and a diagram illustrating the ongoing process, together with the assignment of the values of  $k_a$  and  $k_d$ , are presented in Figure 3 as an example.

The measurements for EB were carried out in two modes: (i) The first is dynamic, using the oscillatory movement of the helix fragments under the influence of changes in the applied voltage. The response signal is affected by a change in hydrodynamic friction as a result of analyte–ligand interaction. (ii) The second is static, in which the changes in fluorescence result only from the influence of analyte–ligand binding on the fluorophore signaling unit, causing physicochemical changes in its local environment, while DNA nanolevers are not electrically actuated in motion. Two methods (weak binders and standard kinetic, which will be discussed later in the manuscript) were used in the static mode. To determine the influence of temperature on the kinetics of the studied processes, the experiments were carried out in the three temperature variants: (i)  $37^\circ \text{C}$ , which corresponds to the temperature of the human body; (ii)  $25^\circ \text{C}$ , a room temperature usually kept in the chemical laboratory as well as for conducting the experiments (e.g., studies of the interaction of pharmaceuticals with DNA in solutions using instrumental techniques such as spectroscopic or electrochemical methods); and (iii)  $15^\circ \text{C}$  to analyze the influence of the lowered temperature on the kinetic parameters. The duration of the association as well as dissociation processes and the flow rate values were determined based on numerous



**Figure 3.** Measuring system. (A) Structure of the chip surface used for research. (B) Scheme of the occurring interaction with the assignment of  $k_a$  and  $k_d$ . (C) Representative curve presenting the processes of association (green line) and dissociation (red line) registered during the measurement of the interaction kinetics.

preliminary measurements (optimization of the procedure; Figure S1).

The results show that, for all measured variants, the response curves have the typical shape, and the association and dissociation processes are visible. However, at the extreme flow rate values (20, 50, and 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), the obtained kinetic parameters were not reproducible. For this reason, the flow of 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ —neither the highest nor the lowest of the tested—has been selected for further analysis. The duration of association and dissociation processes has also been determined and is equal to 30 and 60 s, respectively. These time variants ensure complete analyte dissociation and a sufficiently long bonding time. The time of association below 10 s excluded the repeatability of the obtained results, and the time above 30 s did not affect the efficiency of the process; therefore, it was not regarded as necessary.

Based on the optimization process, the suitability of the dynamic mode for studying the interaction of EB with the DNA chain was checked first. A detailed description of the kinetic measurement pathway in dynamic mode is described in the Experimental Section. Results of the measurements carried

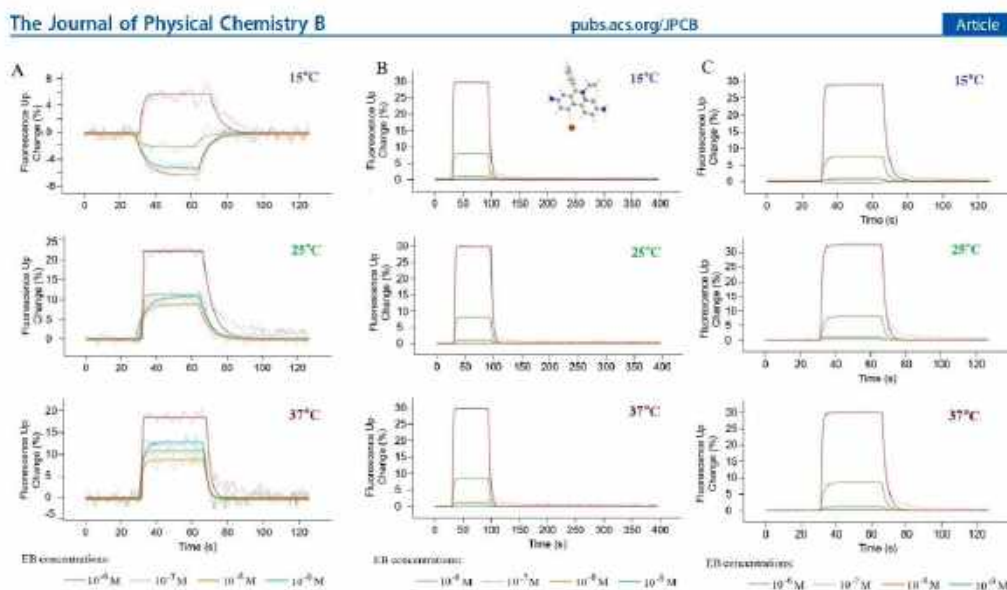
out in the dynamic mode at different temperatures and EB concentrations are shown in Figure 4A.

Unfortunately, the following numerous issues that disqualify the use of this mode in the studies were encountered: (i) no correlation between the concentration of the analyte and the intensity of fluorescence changes was observed, (ii) the measurements performed in this mode were not reproducible, and (iii) the values of the binding ( $k_a$ ) and dissociation ( $k_d$ ) rates obtained on their basis as well as the values of the association constant ( $K_A$ ) were flawed as indicated by high values of standard deviations.

Fortunately, studies on a system in which the DNA helices do not come close to the electrode surface with oscillatory movements, for which the changes in fluorescence are the result of only the binding of the analyte to DNA nanolevers, yielded much better results. In the graphs of the changes in fluorescence during the measurement (Figure 4B), a very sharp curve related to the process of association of EB to DNA was noticed. Such a shape of the slope proves that the binding is fast, even instantaneous. Carrying out the association for the next part of the minute (as assumed for this process) does not bring any significant changes in the fluorescence intensity, as evidenced by the flat segment between about 30 and 90 s of the measurement. The flow of the analyte solution through the chip was then terminated, and the flow of the buffer (without analyte) began, initiating the dissociation process. The shape of the slope representing the dissociation is less sharp, which may be due to the strong DNA–analyte interaction. For the highest applied concentration ( $10^{-6}$  M corresponding to the red line in the plots), the most elongated shape up to approx. 150 s of the measurement was observed. Ultimately, the change in fluorescence descends quite quickly to zero in all the performed measurements, which proves the complete dissociation of EB molecules from the DNA helix as a result of washing with the buffer. Therefore, chip regeneration (DNA nanolever denaturation and freeing the anchor–short single DNA strand for the next functionalization) is not required after each concentration. The determined values of  $k_a$  and  $k_d$  rates together with  $K_A$  and  $K_D$  constants were found to be repeatable (in three independent experiments) and presented in Table 1.

It is apparent from Table 1 that the temperature affects the rate of the association processes taking place (see  $k_a$  values). It might be expected that the increase in the temperature would lead to higher values of the bonding rate. An increase in temperature of the environment of simple low-molecular-weight systems generally causes an increase in the mobility of mentioned systems in solutions and boosts their reactivity. The analysis of  $k_a$  values leads to the conclusion that this tendency remains in the case studied here for the temperatures within the range of 25 to 37  $^{\circ}\text{C}$ . Namely, an increase in the temperature resulted in a slight increase in the value of the association rate. On the other hand, at the temperature of 15  $^{\circ}\text{C}$ , the  $k_a$  values were comparable and even higher than for 37  $^{\circ}\text{C}$ . In the case of large biomolecular systems (such as proteins or nucleic acids), the temperature influences the conformation and thus their reactivity to a bigger extent stronger than for small molecules.<sup>52–56</sup> The influence of the temperature on the conformation of biomolecules is a nontrivial problem. On this score, the increase in the temperature does not necessarily have to translate into an increase in the rate and strength of the interaction. In fact, an increase in temperature above a certain threshold may indicate that the intermolecular interactions will become even weaker.





**Figure 4.** Representative results of analyses of EB interaction with DNA helix carried out in 15, 25, and 37 °C. (A) Dynamic mode, (B) static (standard) mode, and (C) static (weak binders) mode. The thinner lines in each color represent the measurement points, while the bold line represents the fitted data based on which the kinetic parameters are calculated.

**Table 1.** Values (along with Their Standard Deviations in the Brackets) of Determined Association Rates ( $k_a$ ), Dissociation Rates ( $k_d$ ), Association Constants ( $K_A$ ), and Dissociation Constants ( $K_D$ ) for EB Interactions with DNA Measured by the Static Kinetic Method (switchSense Technique) in the PE140 Buffer, Flow Rate 200  $\mu\text{L/s}$

analysis mode	temp [°C]	$k_a$ [ $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	$k_d$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$K_A$ [M]	$K_D$ [ $\text{M}^{-1}$ ]
static (standard)	15	$(1.50 \pm 0.16) \times 10^6$	$0.359 \pm 0.005$	$(2.39 \pm 0.25) \times 10^{-7}$	$(4.19 \pm 0.44) \times 10^6$
	25	$(6.98 \pm 0.63) \times 10^5$	$0.358 \pm 0.007$	$(5.13 \pm 0.47) \times 10^{-7}$	$(1.95 \pm 0.18) \times 10^6$
	37	$(8.55 \pm 0.95) \times 10^5$	$0.360 \pm 0.008$	$(4.22 \pm 0.47) \times 10^{-7}$	$(2.37 \pm 0.27) \times 10^6$
static (weak binders)	15	$(1.69 \pm 0.20) \times 10^6$	$0.391 \pm 0.007$	$(2.32 \pm 0.27) \times 10^{-7}$	$(4.31 \pm 0.51) \times 10^6$
	25	$(6.04 \pm 0.18) \times 10^5$	$0.478 \pm 0.190$	$(7.91 \pm 0.45) \times 10^{-7}$	$(1.26 \pm 0.23) \times 10^6$
	37	$(1.03 \pm 0.19) \times 10^6$	$0.388 \pm 0.008$	$(3.75 \pm 0.69) \times 10^{-7}$	$(2.67 \pm 0.49) \times 10^6$

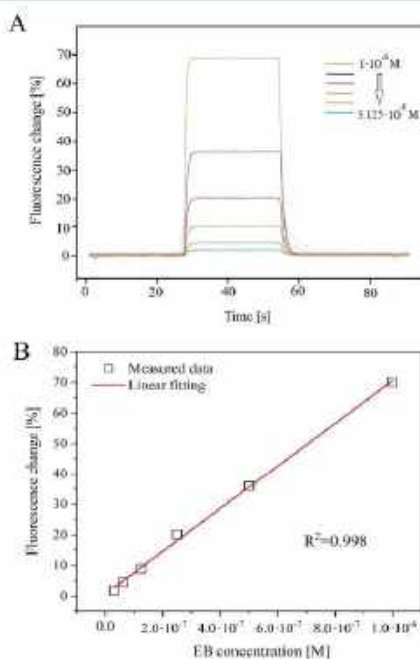
A higher temperature, leading to increased vibrations and movement of the interacting molecules, makes it difficult to maintain the interaction. It is also noteworthy that the movement of the analyte molecules during the measurement is forced by the flow rate, which affects the interaction to a bigger extent than does the temperature (at least in the studied temperature range). For that reason, it was possible to observe an acceleration of the EB to DNA association process as an effect of the temperature decrease (from 25 to 15 °C). This is presumably caused by the fact that, at 15 °C, the DNA adopts the thermodynamically favorable configuration that allows it to have a faster and stronger interaction with EB. Interestingly, the temperature did not have a large impact on the dissociation rate of the EB-DNA adduct ( $k_d$ ). The similar values of  $k_d$  are mainly determined by the buffer flow. Moreover, the differences in the association constant ( $K_A$ ) values for the measurements registered at three different temperatures are mainly a consequence of the differences in the values of the binding rate ( $k_a$ ). The determined kinetic parameters demonstrate that the influence of the temperature on the interaction processes involving biomolecules in the forced flow of the analyte is a complex issue. Determination of the exact

dependencies and correlations would require extensive research.

The results of measurements registered in the standard stationary mode proved to be sufficiently precise to study the kinetics of EB interaction with the DNA helix. However, bearing in mind that the purpose of the study was to also describe the compounds interacting with the DNA chain to a lesser extent, our research was expanded to include also the weak binder mode in the static kinetic method. The plots of the fluorescence changes resulting from the measurements conducted in this mode are presented in Figure 4C. Due to the previously observed high rate values of association and dissociation, the duration of these consecutive processes was shortened. As expected for an EB molecule, the course of changes in fluorescence and thus the shape of the curve remained the same as in the measurements made in the standard static mode (Figure 4). This confirms the possibility of using both static mode subtypes to determine the kinetic parameters of ethidium bromide interaction with DNA.

In the case of EB, the range of concentrations between  $10^{-6}$  and  $10^{-8}$  M resulted in changes in fluorescence at the level of approx. 2 to 30% in the PE140 buffer. These were the most

favorable parameters for the measurements. Too low changes in fluorescence (below approx. 1%) may lead to obtaining values of kinetic parameters with a high standard deviation. The changes in the intensity of fluorescence apart from the nature of the analyte and its binding mode are also influenced by the environment in which the process takes place. Moreover, the influence of different ionic strengths on the conformation of end-tethered DNA molecules on gold surfaces has been proven.<sup>32</sup> An increase in fluorophore activity was observed when registering the association of EB in the PE40 buffer (Figure 5A). The PE40 buffer is characterized by a lower



**Figure 5.** (A) Representative measurement of EB binding kinetics to DNA recorded for six concentrations (from  $1 \times 10^{-8}$  to  $3.125 \times 10^{-4}$  M, dilution factor = 2) in the PE40 buffer at 25 °C. (B) Graph of fluorescence intensity vs. analyte concentration (EB; square points), along with linear fitting (red line;  $R^2 = 0.998$ ).

NaCl concentration (lower ionic strength) compared to the PE140 one (see the Experimental Section). The change of the buffer did not significantly affect the values of the association constants ( $K_A = (1.52 \pm 0.15) \times 10^6$  M at 25 °C). Increasing the intensity of the fluorophore response through the appropriate selection of the buffer can be beneficial in the case of compounds whose binding to DNA causes only slight changes in the fluorescence of the signaling unit.

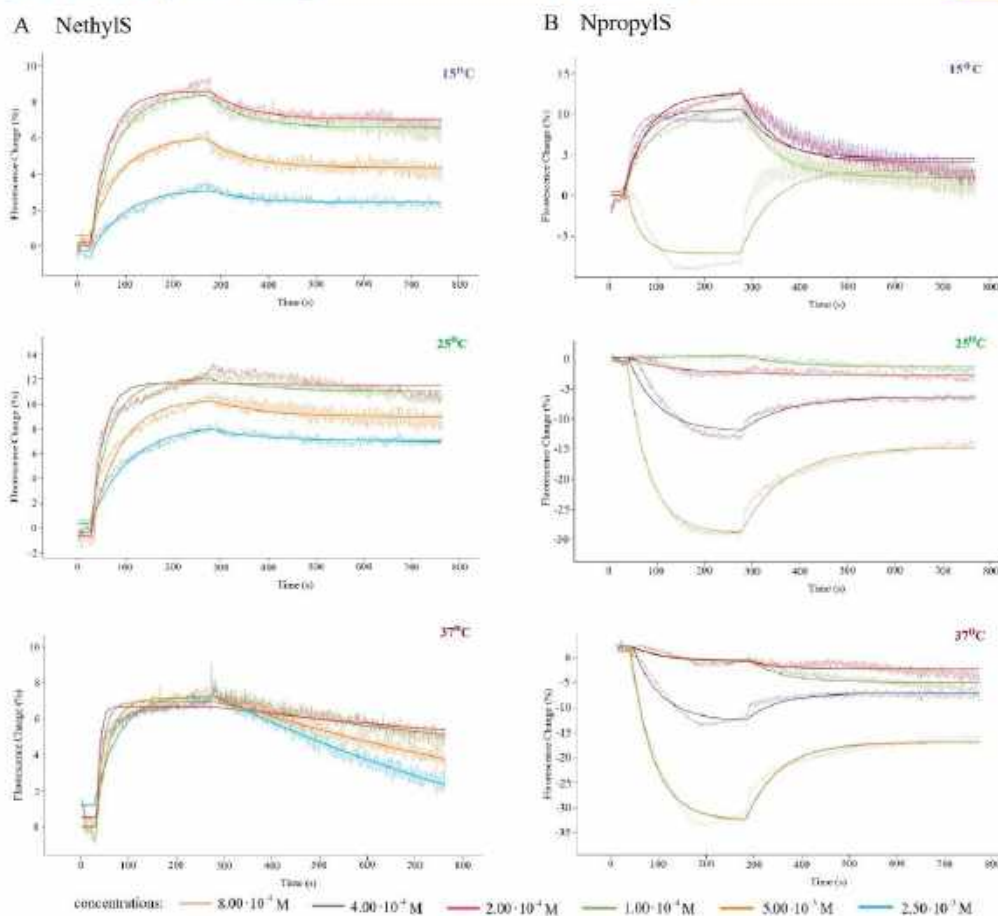
Furthermore, a linear correlation was observed between the concentration of the EB and the change in fluorescence associated with the interaction with the DNA chain (Figure 5B). This confirms the selection of appropriate parameters and the correct carrying out of the experiments.

To sum up, the results of our study for EB indicate that the dynamic method is not appropriate (not sensitive enough) for

the investigation of the interactions of small molecule compounds with the nucleic acid helix. Despite our exhaustive attempts to adjust the measurement parameters, the obtained results remained unsatisfactory. The suitability of the static kinetic mode (for both standard and weak binder subtypes) for the study of the direct interaction of the EB molecule with DNA is justified and demonstrated by (i) the reproducibility of the obtained results (both the nature of the change over time and the percentage of change in fluorescence), (ii) direct correlations between the concentration of the analyte and fluorescence changes (in %), and (iii) the values of the determined  $k_i$  and  $k_d$  rates and  $K_A$  and  $K_D$  constants being reproducible with their low standard deviations.

**Sulfathiazole Binding Studies.** The second small molecule considered in this study was sulfathiazole (STZ). Unlike ethidium bromide, its interaction with DNA is not widely discussed in the available literature. It was reported previously that this sulfonamide derivative interacts with DNA via binding through a helix groove.<sup>22</sup> As for the docking of sulfathiazole, the situation is quite different than with ethidium bromide. This is mainly due to the significant structural differences between STZ and EB (see Figure 2A). In its equilibrium geometry, ethidium is mostly planar, whereas sulfathiazole exhibits a v-like shape (as do all remaining sulfonamides). Namely, for sulfathiazole, the most preferable docking site (I) is located in the first minor groove in the projection presented on the bottom part of Figure 2B, which is between the two minor grooves described in the case of ethidium binding (on the back of the first projection of the DNA helix). As mentioned before, this region of the double strand does not exhibit any specificity regarding the abundance of either AT or CG base pairs. The other two most favored binding modes for sulfathiazole are located on the other side of the DNA strand, i.e., in the fourth minor groove. It consists mostly of AT pairs in this case, demonstrating that the preferences of sulfathiazole toward certain nucleobases might be regarded as somewhat similar to those of ethidium. It appears from the minor-groove focused calculations that in the most popular mode of binding (6.18 kcal/mol), the v-shaped sulfathiazole molecule (the sulfonamide group CSNC dihedral angle equal to  $-47.43^\circ$ ) is parallel to the "base" of the minor groove. In the case of the complex bonded by the highest amount of energy (7.39 kcal/mol), the CSNC dihedral angle in sulfathiazole is equal to  $164.91^\circ$ , which allows for a higher contact area between two interacting systems than was the case for the most popular binding mode.

The strongest binding of sulfathiazole to the studied DNA helix, however, was found to occur within the second minor groove (bottom of Figure 2B). The energy associated with this binding was found to be somewhere in the range between 3.5 and 5.3 kcal/mol, depending on the conformation of sulfathiazole. The receptor in the region of the second minor groove is built more or less equally by both AT and CG pairs. Hence, it is rather the sequence (TCG) that this groove consists of and its closest environment that make the significant binding rather than any specific pair of nucleobases. Altogether, taking all docked conformations of both ethidium bromide and sulfathiazole into account, the average binding energy for EB was found to be ca. 0.58 kcal/mol higher than that of sulfathiazole, i.e., 7.97 vs 7.39 kcal/mol for ethidium and sulfathiazole, respectively. The magnitude of the difference in the average binding energy indicates a comparable affinity of the studied DNA helix toward both compounds.



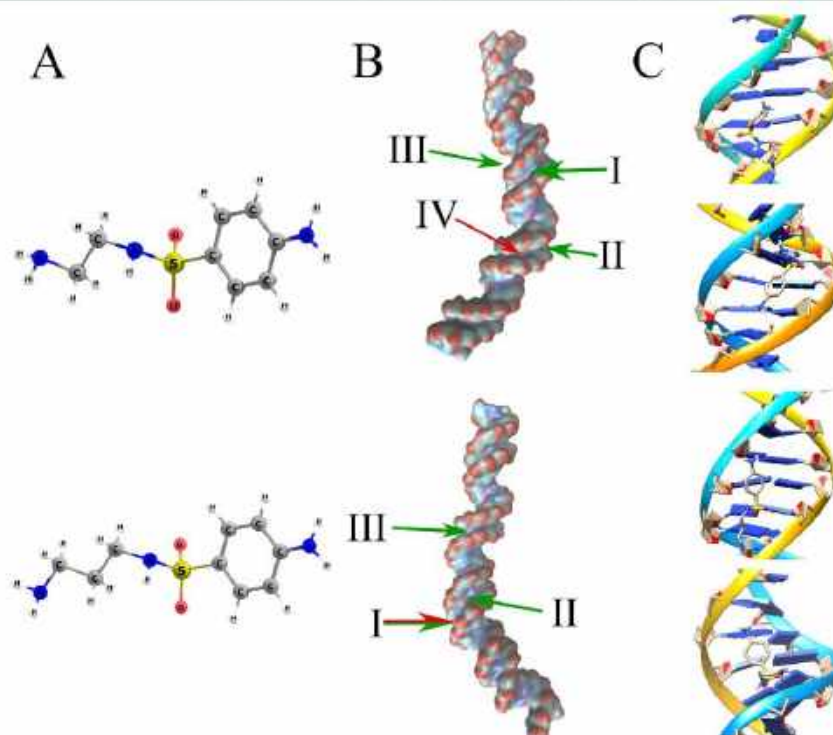
**Figure 6.** Representative results of analyses of (A) NethylS and (B) NpropylS interaction with DNA helix carried out at 15, 25, and 37 °C in static (weak binders) mode. The thinner lines in each color represent the measurement points, while the bold line represents the fitted data based on which the kinetic parameters are calculated.

The experimental results show that the fluorescence changes observed for STZ were significantly lower than those for EB, which might be due to the weaker interaction of this species with DNA, interaction in a different groove of the helix, or another bonding mode. The curves exhibited an analogous shape as in the case of EB with very low values of fluorescence changes. This suggested that the interaction constants were not possible to determine with a reasonably low standard deviation. Unfortunately, these facts expose some limitations of this method. For compounds that interact weakly with DNA (or if changes in fluorescence are very low), one can perform a qualitative analysis, i.e., answer the question of whether under given conditions the compound interacts with DNA. However, in the case of determination of the parameters ( $k_a$ ,  $k_d$ ,  $K_{A,D}$ , and  $K_D$ ) of this interaction, it should be approached with limited confidence. A detailed discussion of the experimental results can be also found in the SI (see pages S6–S9).

**NethylS and NpropylS Binding Studies.** The last research objects included in the present research were two sulfonamide derivatives differing in the length of alkylamino substituent (NethylS and NpropylS). It was demonstrated in the past that even such a small difference in their structure as a presence or absence of a  $-\text{CH}_2-$  unit in the substituent affects acid–base and complex forming properties toward trivalent rhodium and ruthenium ions.<sup>23</sup> Therefore, it seemed necessary to investigate the interactions of these compounds with the DNA chain and to check whether, in this case, we are also able to notice differences in behavior between NethylS and NpropylS. Unfortunately, determination of the binding constant of these compounds utilizing commonly used techniques such as UV–vis spectroscopy or voltammetry turned out to be very problematic. The use of the spectrophotometric approach was prevented by the spectroscopic properties of the studied systems. The absorption

**Table 2.** Values (along with Their Standard Deviations in the Brackets) of Determined Association Rates ( $k_a$ ), Dissociation Rates ( $k_d$ ), Association Constants ( $K_A$ ), and Dissociation Constants ( $K_D$ ) for NethylS and NpropylS Interactions with DNA Measured by the Static Kinetic Method (Weak Binders) in the PE40 Buffer, Flow Rate 200  $\mu\text{L}/\text{S}$

compound	temp [ $^{\circ}\text{C}$ ]	$k_a$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$k_d$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$K_A$ [M]	$K_D$ [ $\text{M}^{-1}$ ]
NethylS	15	$72.7 \pm 3.6$	$(1.23 \pm 0.04) \times 10^{-2}$	$(1.68 \pm 0.10) \times 10^{-4}$	$(5.94 \pm 0.35) \times 10^3$
	25	$77.7 \pm 3.7$	$(8.77 \pm 0.59) \times 10^{-3}$	$(1.13 \pm 0.29) \times 10^{-4}$	$(8.82 \pm 0.72) \times 10^3$
	37	$61.9 \pm 2.7$	$(1.57 \pm 0.04) \times 10^{-2}$	$(2.54 \pm 0.13) \times 10^{-4}$	$(3.93 \pm 0.20) \times 10^3$
NpropylS	15	$26.7 \pm 3.4$	$(1.48 \pm 0.05) \times 10^{-2}$	$(5.53 \pm 0.73) \times 10^{-4}$	$(1.81 \pm 0.24) \times 10^3$
	25	$16.9 \pm 0.5$	$(1.02 \pm 0.02) \times 10^{-2}$	$(6.02 \pm 0.24) \times 10^{-4}$	$(1.66 \pm 0.07) \times 10^3$
	37	$15.4 \pm 0.6$	$(1.19 \pm 0.02) \times 10^{-2}$	$(7.73 \pm 0.34) \times 10^{-4}$	$(1.29 \pm 0.06) \times 10^3$



**Figure 7.** The results of theoretical calculations for NethylS (top) and NpropylS (bottom). (A) Equilibrium structures of *ab initio* optimized NethylS and NpropylS. (B) The positions of the most common binding sites (green) and the sites characterized by the highest value of analyte–receptor binding energy (red). The thickness of each arrow represents the relative abundance of a given clustering. The presented isosurface was obtained from the Gaussian density map as implemented in VMD.<sup>30</sup> (C) The most popular (top) and most strongly bonded (bottom) conformation of an analyte–ligand complex from docking simulations focused on the most important grooves. For the NpropylS, both the most popular and most strongly bonded binding modes are represented by single analyte–receptor complex conformation (the top one). Hence, the second conformation (on the bottom) presented for NpropylS is that of the second most popular binding site.

maxima for NethylS, NpropylS, and DNA in the Tris buffer were located at basically the same wavelength ( $\lambda_{\text{NethylS}} = 262$  nm,  $\lambda_{\text{NpropylS}} = 262$  nm, and  $\lambda_{\text{DNA}} = 260$  nm; Figure S3A). Spectral changes during the titration with increasing DNA concentration were limited to the increase in the intensity of the absorption maximum at  $\lambda \cong 260$  nm (Figure S3B). This was due to the overlapping of the ligand and analyte bands that made determining a reliable value of the binding constant impossible. On the other hand, the electrochemical determination was excluded from the analysis due to a very low

intensity of the current peaks of studied compounds and only slight changes in these signals during the addition of the DNA solution (Figure S4).

To analyze the interactions of NethylS and NpropylS with DNA using the switchSense technique, we used the static (weak binder subtype) kinetic mode. The measurement parameters optimized for the first studied sulfonamide (STZ) turned out to be completely unsuitable for these two derivatives. Therefore, we were forced to determine new parameters for each studied system. In the case of the research

on NethylS and NpropylS, we have noticed two essential differences in the course of the binding process of these compounds to DNA (Figure 6): (i) The association process took much longer, and the curve had a smaller slope than in the case of EB and STZ. (ii) We did not observe complete dissociation of the adduct by the buffer flow despite extending the dissociation time up to 8 min (480 s). To determine the parameters of the binding kinetics with the greatest accuracy possible, the association process was carried out for 4 min (240 s), while the data fitting was performed using a calculation model taking into account the incomplete dissociation of the analyte. This allowed us to adjust the measurement points to the calculation model. This resulted in small errors in the determined rate and constant values for the interaction of NethylS and NpropylS with the DNA chain (Table 2).

As for the differences between NethylS and NpropylS in the course of the interaction, the most important seems to be the decrease in signaling fluorescence (signal weakening) for the NpropylS analyte as opposed to the increase in intensity observed for NethylS. Moreover, in the case of NethylS, analyses carried out at 37 °C had led to problems with repeatability of measurements, and deviations in concentration–signal intensity dependence were observed. For both derivatives, the measurements carried out at 25 °C have shown high repeatability and reliability.

The analysis of the values of the binding rate ( $k_1$ ), in the case of both compounds, leads to the conclusion that the binding of the presented sulfonamides to the helix occurs much slower (about 1000× than EB and almost 100× than STZ). Therefore, these systems need much more time to interact effectively. The adduct dissociation process, described by the  $k_2$  value, also takes place much slower (10–100× compared to EB and STZ). It came as a surprise that the dissociation (especially for the NethylS–DNA adduct) was not complete even during a long process using a high buffer flow. The determined stability constant values ( $K_A$  defined as  $\frac{k_1}{k_2}$ ) are in the range of  $10^3$ – $10^4$   $M^{-1}$ , so they can be regarded as somewhat low. On the other hand, however, high resistance of the created adduct to dissociation caused by the buffer flow can be observed. This suggests a completely different mode of NethylS and NpropylS interaction with the DNA chain than in the case of EB that tends to bind quickly and strongly, but the dissociation of the adduct by the buffer flow is fast and complete. Moreover, although NethylS and NpropylS are sulfonamides, as is sulfathiazole (STZ), the nature of their interaction also seems to be significantly different. The presence of an alkylamino substituent instead of a thiazole ring in the tested analyte promotes the formation of a stable and durable adduct with DNA.

Theoretical calculations helped explain this phenomenon. The docking simulations have revealed that for the NethylS, the two most important binding sites are located in two separate grooves, namely, the second and third ones counting from the anchor (see Figure 7). The aforesaid docking sites correspond to the most strongest and most preferred binding site, respectively. Hence, the most strongly bonded interaction of the NethylS–receptor occurs via the same groove as was the case for both EB and STZ. In said docking, the value of the CSNC angle in the NethylS analyte is equal to 123.1°, whereas that of the NCCN from the *N*-alkyl part of the analyte is equal to –4.1°, allowing for the formation of an intramolecular hydrogen bond between the H atom of the –NH<sub>2</sub> group and

N atom of the sulfonamide group. As for the orientation of the analyte to the receptor, the first one seems to be oriented to the two DNA strands in a parallel manner (see Figure 7). The value of the binding energy corresponding to the described docking is equal to 8.47 kcal/mol, which is higher than the corresponding value for both EB (7.97 kcal/mol) and STZ (7.39 kcal/mol). As mentioned earlier, the most popular docking site for NethylS is located in the third minor groove. In this case, the value of the CSNC dihedral angle is equal to 80.3°. Instead of the formation of intramolecular hydrogen bonds as was the case for the most strongly bonded configuration, the two H atoms of the alkyl –NH<sub>2</sub> group are now involved in the formation of intermolecular hydrogen bonds with the oxygen atoms of one of the phosphate groups of the receptor. These interactions are expected to stabilize the discussed configuration. The corresponding binding energy (7.40 kcal/mol) is significantly higher than both that of EB (6.87 kcal/mol) and that of STZ (6.18 kcal/mol).

The NethylS docking simulations reveal that it is expected to interact with DNA more strongly than both EB and STZ. As mentioned earlier, this is likely due to the presence of the additional –NH<sub>2</sub> group in NethylS, which paves the way for the formation of three hydrogen bonds with the receptor. Contrary to the EB, the –NH<sub>2</sub> group of NethylS (and NpropylS for that matter) has a significantly higher range of motion, as it is attached to the somewhat motile alkyl group. This, in turn, allows for a better adjustment of the formed hydrogen bonding net than is the case with the –NH<sub>2</sub> groups of EB that are attached to the rather rigid moiety of conjugated aromatic rings.

The situation is quite similar in the case of NpropylS. Its most important docking site is located in the second minor groove, as the most preferred docking, which also happens to be the most strongly bonded one, is located there. Moreover, the second most preferred clustering also happens in the discussed groove. On the other hand, the third most favored docking site for NpropylS is located in the third minor groove. It appears from the molecular docking simulations that both NethylS and NpropylS have a high affinity toward the same parts of the studied DNA helix (second and third minor groove). This is of no surprise, as the compounds in question are structurally alike.

As it turned out from the calculations, for the NpropylS, the most popular docking and the most strongly bonded one correspond to the same configuration (see Figure 7). Hence, unlike for the remaining cases, for NpropylS, the first presented clustering corresponds to the most preferable and most strongly bonded configuration, whereas the second one corresponds to the second most preferred docking site. The DNA–NpropylS binding energy calculated for the most important (most preferred and most strongly bonded) docking was found to be equal to 8.55 kcal/mol, making the NpropylS the most strongly bonded analyte of all four studied in this paper. Not only that, but as mentioned before, the most strongly bonded configuration is also the most preferred one. In the case of the three remaining compounds, the dockings corresponding to the most strongly bonded configuration constitute only a small fraction of all clusterings. In the most important clustering, the CSNC dihedral angle in NpropylS is equal to –134.8°, and all its H atoms that are attached to the *N*-type hydrogen bond donors form bonds with the receptor through the O atoms of either the phosphate group or deoxyribose moiety.

The value of binding energy corresponding to the second most preferred docking site for NpropylS was calculated to be equal to 5.42 kcal/mol, which is significantly lower than the previously discussed one, although they are located in the same minor groove. The  $-28.5^\circ$  CSNC angle in these conformations results in an L-like shape of the whole sulfonamide and enforces less favorable interaction with the receptor than was the case for the first NpropylS docking considered. As an effect of that, only some of the H atoms of the analyte are involved in hydrogen bonding with the receptor.

## CONCLUSIONS

The current paper presents another possible application and optimization of the switchSense technique for the study of the interactions of small molecules with DNA helix. This technique dominates over the other commonly used methods for the study of such interactions because it enables real-time measurements. Moreover, the immobilization of DNA to the chip surface only via an anchor strand (see Figure 1A) makes the DNA chain flexible. Our research confirms that the use of the measuring system shown in Figure 3A for the study of the interaction of DNA with small molecules is justified and, more importantly, brings the desired results.

The presented results confirm that the switchSense technique can be used to study DNA–small molecule interactions only in the static mode. In the experiments performed with EB, the changes in fluorescence were high, confirming the EB–DNA adduct formation as well as the dissociation process. The results show a linear dependence between the analyte concentration and signal changes. The experiments were repeated (at least three times), and dissociation and association constants with acceptable values of standard deviation were obtained. The results of molecular docking simulations performed for studied compounds provided additional information. These results indicate that both the most preferable and the one within which EB interacts with the strongest docking site are in the same minor groove (the second one from the anchor part). EB showed a significant affinity to the AT pairs, which are abundant in the aforesaid groove.

Unfortunately, the switchSense technique is limited, which has been noticed in the case of the second analyzed compound, STZ, for which interaction with DNA caused rather modest changes in the fluorophore signal and whose bonding was much weaker than EB. In this case, the conducted experiments allowed us to conclude that although STZ interacts with DNA, the procured association and dissociation constant values are affected by the substantial error. To further our research, we are planning on solving this obstacle. In the case of STZ, the most preferable docking site was found to occur in the first minor groove (from the anchor side). However, it was established that the STZ binds the strongest to the studied DNA within the second minor groove. It was also found that the average compound–DNA binding energy of EB was higher than that of STZ, which may explain the results of the conducted experiments for the DNA–STZ system.

The research results obtained for NethylS and NpropylS turned out to be both compelling and promising. It has been demonstrated that both of these compounds bind to the DNA helix rather slowly, but the adduct formed in the process is stable and resistant to dissociation forced by buffer flow. This might be due to the formation of hydrogen bonds as a result of interaction with DNA. The applied theoretical model of

incomplete dissociation has allowed for both a great fit to the measuring points and obtainment of the values of kinetic parameters with small standard deviations. The collected results predispose NethylS and NpropylS as decent candidates for further biological research to determine their antimicrobial and anticancer activity.

Taken together, our findings suggest that the switchSense technique is a decent alternative to the previously used methods of studying the interactions of small compounds with DNA. The switchSense technique provides information on both binding rate ( $k$ ) and binding constant ( $K$ ), whereas methods such as voltammetric or spectroscopic methods provide data on the latter only. The knowledge of binding rates gives a much deeper insight into ongoing processes.

## AUTHORS' CONTRIBUTION STATEMENT

S. Ramotowska: conceptualization of part of kinetic measurements, determination of kinetic parameters for ethidium bromide, writing a part of the original draft. P. Spisz: conceptualization of part of kinetic measurements, determination of kinetic parameters for sulfathiazole, writing a part of the original draft. J. Brzeski: conceptualization and investigation of the computational part of studies, writing a part of the original draft. A. Ciesielska: determination of kinetic parameters, spectroscopic and voltammetric studies for NethylS and NpropylS. M. Makowski: conceptualization, supervision, funds acquisition, writing – review and editing.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcb.2c03138>.

The Cartesian coordinates (in Å) together with electronic energies ( $E$ ), enthalpies ( $H$ ), and Gibbs free energies ( $G$ ) (in a.u.) corresponding to the studied ligands (Table S1). Example graphs of EB (concentration range:  $1 \times 10^{-6}$ – $3.125 \times 10^{-8}$  M) kinetic measurements at various flow rate values and time variants of association (A) and dissociation (D) processes, used to select the optimal measurement conditions. (A) 20  $\mu\text{L/s}$ , A: 35 s, D: 70 s; (B) 50  $\mu\text{L/s}$ , A: 30 s, D: 60 s; (C) 100  $\mu\text{L/s}$ , A: 25 s, D: 50 s; (D) 200  $\mu\text{L/s}$ , A: 20 s, D: 40 s; (E) 400  $\mu\text{L/s}$ , A: 15 s, D: 30 s; and (F) 500  $\mu\text{L/s}$ , A: 10 s, D: 20 s (Figure S1). Sulfathiazole binding studies—experimental studies. Representative results of analyses of STZ interaction with DNA helix carried out at 15, 25, and 37  $^\circ\text{C}$ : (A) static (standard) mode and (B) static (weak binders) mode. The thinner lines in each color represent the measurement points, while the bold line represents the fitted data based on which the kinetic parameters are calculated (Figure S2). Values (along with their standard deviations in the brackets) of determined association rates ( $k_a$ ), dissociation rates ( $k_d$ ), association constants ( $K_a$ ), and dissociation constants ( $K_d$ ) for STZ interactions with DNA measured by the static kinetic method (switchSense technique) in the PE40 buffer, flow rate 200  $\mu\text{L/s}$  (Table S2). Spectroscopic and voltammetric studies—experimental. (A) Spectra of DNA (red line;  $\epsilon = 2.5 \times 10^{-4}$  M), NethylS (black line;  $\epsilon = 7.2 \times 10^{-5}$  M), and NpropylS (blue line;  $\epsilon = 7.2 \times 10^{-5}$  M) solutions registered in Tris buffer at pH 7.4.

(B) The titration spectral curves obtained for NethylS with different DNA concentrations (from 0 to 80  $\mu\text{M}$ ). The arrow shows the direction of change upon the increase of DNA (Figure S3). Cyclic voltammograms registered for  $2 \times 10^{-4}$  M NethylS in the absence and the presence of 20–200  $\mu\text{M}$  ct-DNA on the glassy carbon electrode. Scan rate: 100 mV/s, temperature: 25 °C (Figure S4) (PDF)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

Mariusz Makowski – Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Gdańsk 80-308, Poland; [orcid.org/0000-0002-7342-722X](https://orcid.org/0000-0002-7342-722X); Email: [mariusz.makowski@ug.edu.pl](mailto:mariusz.makowski@ug.edu.pl)

### Authors

Sandra Ramotowska – Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Gdańsk 80-308, Poland

Paulina Spisz – Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Gdańsk 80-308, Poland

Jakub Brzeski – Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Gdańsk 80-308, Poland; Department of Chemistry, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania 15260, United States; [orcid.org/0000-0003-4865-0152](https://orcid.org/0000-0003-4865-0152)

Aleksandra Ciesielska – Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Gdańsk 80-308, Poland

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jpcc.2c03138>

### Author Contributions

\*S.R. and P.S. contributed equally.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Polish National Science Centre (NCN) under grant UMO-2019/33/B/ST4/00031. The calculations have been carried out using resources provided by Wrocław Centre for Networking and Supercomputing (<http://wcss.pl>) grant no. S60.

## REFERENCES

- Rant, U.; Arinaga, K.; Fujita, S.; Yokoyama, N.; Abstreiter, G.; Tomow, M. Dynamic Electrical Switching of DNA Layers on a Metal Surface. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2441–2445.
- Rant, U.; Arinaga, K.; Fujita, S.; Yokoyama, N.; Abstreiter, G.; Tomow, M. Structural Properties of Oligonucleotide Monolayers on Gold Surfaces Probed by Fluorescence Investigations. *Langmuir* **2004**, *20*, 10086–10092.
- Arinaga, K.; Rant, U.; Tomow, M.; Fujita, S.; Abstreiter, G.; Yokoyama, N. The Role of Surface Charging during the Coadsorption of Mercaptohexanol to DNA Layers on Gold: Direct Observation of Desorption and Layer Reorientation. *Langmuir* **2006**, *22*, 5560–5562.
- Arinaga, K.; Rant, U.; Knežević, J.; Pringsheim, E.; Tomow, M.; Fujita, S.; Abstreiter, G.; Yokoyama, N. Controlling the Surface Density of DNA on Gold by Electrically Induced Desorption. *Biosens. Bioelectr.* **2007**, *23*, 326–331.
- Ramotowska, S.; Ciesielska, A.; Makowski, M. What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA-Drug Interactions? *Molecules* **2021**, *26*, 3478.
- 12 Principles of Green Chemistry*. American Chemical Society. <https://www.acs.org/content/acs/ea/greenchemistry/principles/12-principles-of-green-chemistry.html> (accessed 2022-04-26).
- Langer, A.; Hampel, P. A.; Kaiser, W.; Knezevic, J.; Welte, T.; Villa, V.; Maruyama, M.; Svejda, M.; Jähner, S.; Fischer, F.; et al. Protein Analysis by Time-Resolved Measurements with an Electro-Switchable DNA Chip. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2099.
- Langer, A.; Schräml, M.; Strasser, R.; Daub, H.; Myers, T.; Heindl, D.; Rant, U. Polymerase/DNA Interactions and Enzymatic Activity: Multi-Parameter Analysis with Electro-Switchable Biosurfaces. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12066.
- Ponzo, I.; Müller, F. M.; Daub, H.; Matscheko, N. A DNA-Based Biosensor Assay for the Kinetic Characterization of Ion-Dependent Aptamer Folding and Protein Binding. *Molecules* **2019**, *24*, 2877.
- Daub, H.; Traxler, L.; Ismajli, F.; Groitl, B.; Itzen, A.; Rant, U. The Trimer to Monomer Transition of Tumor Necrosis Factor-Alpha Is a Dynamic Process That Is Significantly Altered by Therapeutic Antibodies. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 9265.
- Lux, G.; Langer, A.; Pshenitza, M.; Karsunke, X.; Strasser, R.; Niessner, R.; Knopp, D.; Rant, U. Detection of the Carcinogenic Water Pollutant Benzo[a]Pyrene with an Electro-Switchable Biosurface. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 4538–4545.
- Cléry, A.; Sobier, T. J. M.; Welte, T.; Langer, A.; Allain, F. H. T. SwitchSENSE: A New Technology to Study Protein-RNA Interactions. *Methods* **2017**, *118–119*, 137–145.
- Aman, K.; Padroni, G.; Parkinson, J. A.; Welte, T.; Burley, G. A. Structural and Kinetic Profiling of Allosteric Modulation of Duplex DNA Induced by DNA-Binding Polyamide Analogues. *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25*, 2757–2763.
- Staffler, R.; Pasternack, R.; Hils, M.; Kaiser, W.; Möller, F. M. Nucleotide Binding Kinetics and Conformational Change Analysis of Tissue Transglutaminase with SwitchSENSE. *Anal. Biochem.* **2020**, *605*, No. 113719.
- Knezevic, J.; Langer, A.; Hampel, P. A.; Kaiser, W.; Strasser, R.; Rant, U. Quantitation of Affinity, Avidity, and Binding Kinetics of Protein Analytes with a Dynamically Switchable Biosurface. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15225–15228.
- Wenskowsky, L.; Wagner, M.; Reusch, J.; Schreuder, H.; Matter, H.; Opatz, T.; Petry, S. M. Resolving Binding Events on the Multifunctional Human Serum Albumin. *Chem. MedChem.* **2020**, *15*, 738–743.
- Fuller, W.; Waring, M. J. A Molecular Model for the Interaction of Ethidium Bromide with Deoxyribonucleic Acid. *Ber. Bunsengesell. für phys. Chem.* **1964**, *68*, 805–808.
- Waring, M. J. Complex Formation between Ethidium Bromide and Nucleic Acids. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 269–282.
- Garbett, N. C.; Hammond, N. B.; Graves, D. E. Influence of the Amino Substituents in the Interaction of Ethidium Bromide with DNA. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 3974–3981.
- Vardevanyan, P. O.; Antonyan, A. P.; Manulyan, G. A.; Karapetyan, A. T. Study of Ethidium Bromide Interaction Peculiarities with DNA. *Exp. Mol. Med.* **2001**, *33*, 205–208.
- Vardevanyan, P. O.; Antonyan, A. P.; Parsadanyan, M. A.; Davtyan, H. G.; Karapetyan, A. T. The Binding of Ethidium Bromide with DNA: Interaction with Single- and Double-Stranded Structures. *Exp. Mol. Med.* **2003**, *35*, 527–533.
- Mizdal, C. R.; Stefanello, S. T.; da Costa Flores, V.; Agostt, V. A.; Bonez, P. C.; Rossi, G. G.; da Silva, T. C.; Antunes Soares, F. A.; de Lourenço Marques, L.; de Campos, M. M. A. The Antibacterial and Anti-Biofilm Activity of Gold-Complexed Sulfonamides against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Microb. Pathog.* **2018**, *123*, 440–448.
- Feng, G.; Zou, W.; Zhong, Y. Sulfonamides Repress Cell Division in the Root Apical Meristem by Inhibiting Polates Synthesis. *J. Hazard. Mater. Adv.* **2022**, *5*, No. 100045.
- Ozdemir, U. O.; Orzbek, N.; Genç, Z. K.; İlbiz, F.; Gündüzalp, A. B. New Bioactive Silver(I) Complexes: Synthesis, Characterization, Anticancer, Antibacterial and Anticarbonic Anhydrase II Activities. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1138*, 55–63.
- Aslan, H. G.; Özcan, S.; Karacan, N. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Salicylaldehyde Benzensulfonfylhydrazone (Hsalbsmh) and Its Nickel(II), Palladium(II), Platinum(II),

- Copper(II), Cobalt(II) Complexes. *Inorg. Chem. Commun.* **2011**, *14*, 1550–1553.
- (26) Pérez, C.; Díaz-García, C. V.; Agudo-López, A.; del Solar, V.; Cabrera, S.; Aguiló-Ortuño, M. T.; Navarro-Ranninger, C.; Alernán, J.; López-Martín, J. A. Evaluation of Novel Trans-Sulfonamide Platinum Complexes against Tumor Cell Lines. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 360–368.
- (27) Kowalik, M.; Bezeski, J.; Gawrońska, M.; Kazmierczuk, K.; Makowski, M. Experimental and Theoretical Investigation of Conformational States and Noncovalent Interactions in Crystalline Sulfonamides with a Methoxyphenyl Moiety. *Cryst. Eng. Comm.* **2021**, *23*, 6137–6162.
- (28) Spisz, P.; Chylewska, A.; Królicka, A.; Ramotowska, S.; Dąbrowska, A.; Makowski, M. Stimulation of Sulfonamides Antibacterial Drug Activity as a Result of Complexation with Ru(III): Physicochemical and Biological Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13482.
- (29) Ciesielska, A.; Gawrońska, M.; Makowski, M.; Ramotowska, S. Sulfonamides Differing in the Alkylamino Substituent Length – Synthesis, Electrochemical Characteristic, Acid-Base Profile and Complexation Properties. *Polyhedron* **2022**, *221*, No. 115868.
- (30) Chai, J.-D.; Head-Gordon, M. Long-Range Corrected Hybrid Density Functionals with Damped Atom–Atom Dispersion Corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6615–6620.
- (31) Krishnan, R.; Binkley, J. S.; Seeger, R.; Pople, J. A. Self-consistent Molecular Orbital Methods. XX. A Basis Set for Correlated Wave Functions. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 650–654.
- (32) Barone, V.; Cossi, M. Quantum Calculation of Molecular Vibrations and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995–2001.
- (33) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; et al. *Gaussian 16*; Revision C.01. Gaussian, Inc.: Wallingford CT **2016**.
- (34) Madge, T. J.; Case, D. A. *Modeling Unusual Nucleic Acid Structures*; American Chemical Society, **1998**.
- (35) Ghosh, A.; Bansal, M. A. Glossary of DNA Structures from A to Z. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2003**, *59*, 620–626.
- (36) Zgarbová, M.; Šponer, J.; Otyepka, M.; Cheatham, T. E., III; Galindo-Murillo, R.; Juváčka, P. Refinement of the Sugar–Phosphate Backbone Torsion Beta for AMBER Force Fields Improves the Description of Z- and B-DNA. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 5723–5736.
- (37) Jørgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935.
- (38) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An  $N \log(N)$  Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
- (39) Ryckaert, J.-P.; Cicotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of *n*-Alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327–341.
- (40) Case, D. A.; Babin, V.; Berryman, J.; Betz, R. M.; Cai, Q.; Cerutti, D. S.; Cheatham, T.; Darden, T.; Duke, R.; Gohlke, H.; et al. *AMBER 14*. University of California: San Francisco; **2014**.
- (41) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.
- (42) Gasteiger, J.; Marsili, M. Iterative Partial Equalization of Orbital Electronegativity—a Rapid Access to Atomic Charges. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3219–3228.
- (43) Strekowski, L.; Wilson, B. Noncovalent Interactions with DNA: An Overview. *Mutat. Res./Fund. Mol. M* **2007**, *623*, 3–13.
- (44) Řeha, D.; Kabeláč, M.; Ryjáček, F.; Šponer, J.; Šponer, J. E.; Eštner, M.; Suhai, S.; Hobza, P. Intercalators. 1. Nature of Stacking Interactions between Intercalators (Ethidium, Daunomycin, Ellipticine, and 4',6-Diaminide-2-Phenylindole) and DNA Base Pairs. Ab Initio Quantum Chemical, Density Functional Theory, and Empirical Potential Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3366–3376.
- (45) Galindo-Murillo, R.; Cheatham, T. E., III Ethidium Bromide Interactions with DNA: An Exploration of a Classic DNA–Ligand Complex with Unbiased Molecular Dynamics Simulations. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 3735–3747.
- (46) Banerjee, A.; Majumder, P.; Sanyal, S.; Singh, J.; Jana, K.; Das, C.; Dasgupta, D. The DNA Intercalators Ethidium Bromide and Propidium Iodide Also Bind to Core Histones. *FEBS Open Bio* **2014**, *4*, 251–259.
- (47) Mishra, A.; Ekka, M. K.; Maiti, S. Influence of Ionic Liquids on Thermodynamics of Small Molecule–DNA Interaction: The Binding of Ethidium Bromide to Calf Thymus DNA. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 2691–2700.
- (48) Andrežalová, L.; Országhová, Z. Covalent and Noncovalent Interactions of Coordination Compounds with DNA: An Overview. *J. Inorg. Biochem.* **2021**, *225*, No. 111624.
- (49) Patterson, S. E.; Coxon, J. M.; Strekowski, L. Intercalation of Ethidium and Analogues with Nucleic Acids: A Molecular Orbital Study. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 277–281.
- (50) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38.
- (51) Bilobrzaska, W.; Niedzialkowski, P.; Malinowska, N.; Cebula, Z.; Ossowski, T. Analysis of Interactions between Calf Thymus DNA and 1,5-Di(1-Piperazin-1-Yl)Anthracene-9,10-Dione Using Spectroscopic and Electrochemical Methods. *J. Mol. Liq.* **2019**, *289*, No. 111080.
- (52) Kaiser, W.; Rant, U. Conformations of End-Tethered DNA Molecules on Gold Surfaces: Influences of Applied Electric Potential, Electrolyte Screening, and Temperature. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7935–7945.
- (53) Geggier, S.; Kotlyar, A.; Vologodskii, A. Temperature Dependence of DNA Persistence Length. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 1419–1426.
- (54) Zhou, J.; Gregurick, S. K.; Kraeger, S.; Schwarz, F. P. Conformational Changes in Single-Strand DNA as a Function of Temperature by SANS. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 544–551.
- (55) Uversky, V. N. Intrinsically Disordered Proteins and Their Environment: Effects of Strong Denaturants, Temperature, pH, Counter Ions, Membranes, Binding Partners, Osmolytes, and Macromolecular Crowding. *Protein J* **2009**, *28*, 305–325.
- (56) Tang, K. E. S.; Dill, K. A. Native Protein Fluctuations: The Conformational-Motion Temperature and the Inverse Correlation of Protein Flexibility with Protein Stability. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1998**, *16*, 397–411.



## Theoretical Study on the Alkylimino-Substituted Sulfonamides with Potential Biological Activity

Jakub Brzeski, Aleksandra Ciesielska, and Mariusz Makowski\*

Cite This: *J. Phys. Chem. B* 2023, 127, 6620–6627

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** Antibiotics play a key role in the fight against bacterial diseases. However, bacteria quickly learn how to minimize the effects of antibiotics and strengthen their resistance. Thus, the fight against them becomes more and more difficult and there is a constant search for new bactericidal compounds. It is important in this type of search to determine the basic properties of compounds such as  $pK_a$ , hydrogen bond formation, or hydrophobicity. Here, we present the results of our *in silico* study of five sulfonamide derivatives differing in alkylamine substituent length. Based on our results, we propose a model of three possible  $pK_a$  values for each of the studied compounds. Interestingly, the use of Muckerman's approach for  $pK_a$  determination exhibits that theoretical and experimental results are in very good agreement. Intramolecular hydrogen bond formation affects  $pK_a$ . The strength of the H-bond interaction increases from ethyl to butylamine and then decreases with the elongation of the alkylamine chain. The obtained partition coefficients (expressed here in the value of  $\log P$ ) increase with the number of carbon atoms in the alkylamine chain following Lipinski's rule of five. The presented results provide important structural, physicochemical, and thermodynamic information that allows for the understanding of the influence of some sulfonamides and their possible activity.

### INTRODUCTION

Sulfa drugs comprise a wide range of pharmaceuticals used for the treatment of various diseases. Among others, those characterized by antibacterial (e.g., Sulfathiazole<sup>1</sup>), anticancer (e.g., E7070<sup>2</sup>), and antiviral (e.g., Amprenavir<sup>3</sup>) seem to attract the most attention. Although this group of pharmaceuticals exhibits a broad range of biological activity, it is mostly known for its antimicrobial properties. These are based on structural similarity to *para*-aminobenzoic acid (PABA) with which it competes for the binding to dihydropteroate synthetase (DHPS) enzyme and thus prevents the synthesis of bacterial dihydrofolic acid.<sup>4</sup> This in turn prevents the replication of bacteria. One of the most important sulfa drugs is sulfamerazine, which, combined with trimethoprim, is used in the treatment of diseases like bronchitis, pneumonia, and urinary infections.<sup>5</sup> Moreover, there are records claiming that it has chemotherapeutic activity as well.<sup>6</sup> Another sulfa drug that is currently being used in the treatment of *dermatitis herpetiformis* (Dühring's disease) is sulfapyridine.<sup>7</sup> The versatility of medical effects exhibited by pharmaceuticals based on sulfanilamide derivatives is indicative of their therapeutic potential.

The process of designing a new drug is complicated and involves selecting the appropriate properties of the compound depending on its site of action and the route of administration. Particular attention should be paid to the structure, particle

size, and stability of chemicals, biological agents, and metabolite products. Moreover, it is also very important hydrophilic–lipophilic nature of the compound, its solubility, acid–base properties, degree of ionization, thermal nature, activity, and cytotoxicity. In the aqueous environment, polar compounds are easily excreted by the kidneys but may have difficulty with the barrier of lipid membranes. However, lipophilic compounds may not penetrate the blood, and if they do get there, they are absorbed by fat cells. However, regardless of the mode of delivery used, water solubility will be required to ensure that the active molecules can achieve their desired goals, for example, solubility in the gastrointestinal tract, blood plasma, or lung fluid. Taken together, a prototype drug molecule that has a better chance of reaching the target will be soluble, moderately lipophilic, and have sufficient structural features to effectively interact with the target without unduly interfering with the many other functional molecules and macromolecules it encounters.<sup>8</sup>

Received: March 24, 2023

Revised: June 14, 2023

Published: July 21, 2023



According to the *Outpatient Antibiotic Prescriptions* report from 2020, the most often prescribed classes of antibiotics in the United States were (with the number of prescriptions given in parentheses) penicillins (43 mln), cephalosporins (30 mln), macrolides (29 mln), tetracyclines (23 mln), and  $\beta$ -Lactams with increased activity (21 mln).<sup>9</sup> Less frequently prescribed antibiotic groups, including sulfonamides, were not listed in the aforementioned report. The former widespread use of sulfonamide drugs (which are in use since the 1930s) is currently limited, mostly due to the widespread resistance.<sup>10</sup> The other factors affecting their current and somewhat scarce application, as compared to former commonness, are the side effects associated with their use<sup>11</sup> and the availability of different groups of antibiotics. It is worth noting here that the same reason for the decline of the application of sulfonamide antibiotics affects every other antibiotic class nowadays. The overuse of discussed drugs and the paucity of new antibiotics have led to a global crisis.<sup>12</sup>

Because of the continuous enhancement of antibiotics resistance in general, new sulfonamides may be regarded as promising antimicrobial drugs. This is due to both inexpensive and relatively simple synthesis, as compared to other antibiotic groups. The synthesis of novel sulfa drugs ought to be followed by a scrupulous assessment of both physicochemical properties and biological activity. The particular stress should be laid on the side effects of the aforementioned species, with proper conclusions drawn from past research on sulfonamide pharmaceuticals. This paper is an attempt to lay a foundation for described experimental endeavors because it describes the physicochemical properties of 5 sulfonamides (4-amino-N-(2-aminoethyl)benzenesulfonamide–NethylS, 4-amino-N-(2-aminopropyl)benzenesulfonamide–NpropylS, 4-amino-N-(2-aminobutyl)benzenesulfonamide–NbutylS, 4-amino-N-(2-aminopentyl)benzenesulfonamide–NpentylS, and 4-amino-N-(2-aminohexyl)benzenesulfonamide–NhexylS) with the predominant use of quantum chemical methods. All sulfonamides regarded in this paper differ in the alkylamine substituent length (see Figure 1 below). The alkylamine moiety itself is

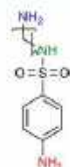


Figure 1. General formula of sulfonamides analyzed in this study, where  $n$  is the number of  $-\text{CH}_2-$  groups within the structure;  $n = 2-6$ .

present in various drugs exhibiting a wide range of activities, such as an antituberculosis agent in Ethambutol<sup>13</sup> or antiasthmatic in Aminophylline.<sup>14</sup> The parameters reported herein are crucial for a correct assessment of the activity of analyzed sulfonamides. Our analysis provides the structural and energy differences between studied molecules and their isomers, acid–base equilibria, intramolecular hydrogen bonds, and hydrophobicity.

The geometrical structure of sulfa drugs determines their biological reactivity as it influences the binding to the receptor, e.g., dihydropteroate synthetase. The differences in electronic energies (or Gibbs free energies) between isomers regulate the population of each isomer at the given conditions. Since isomers of various pharmaceuticals have been shown to exhibit disparate biological activity,<sup>15</sup> the said analysis appears crucial. The protonation state, on the other hand, except for affecting activity, influences the permeation of various membranes within the human body. Values of  $\text{pK}_a$  allow for the prediction of the protonation form of the pharmaceutical at each step of the metabolic pathway, which is crucial in the design of therapy. Another important factor affecting the reactivity is the partition coefficient (expressed here in the value of  $\log P$ ), which allows for the assessment of the distribution of a given pharmaceutical within the body. The investigation of the intramolecular hydrogen bond, on the other hand, gives an insight into both the acidity and hydrophobicity of the studied compounds.

## METHODS

The dissociation constant of the acid provides information about the protolytic form; therefore, we proposed the following dissociation equilibria (Figure 2), the validity of which is described in the next part of the publication.

The equilibrium structures of all compounds were obtained by applying meta-GGA approximation-based hybrid M06 functional<sup>16</sup> with split-valence triple- $\zeta$  Pople-type basis set-6-311++G(2d,2p).<sup>17,18</sup> The Berny (with GEDIIS) algorithm was used during the minimization.

The influence of solvents (water with  $\epsilon = 78.3553$  and *n*-octanol with  $\epsilon = 9.8629$ ) was approximated by the application of the Self-Consistent Reaction Field (SCRF) method<sup>19</sup> and the SMD model.<sup>20</sup> The harmonic vibrational frequencies characterizing the stationary points were evaluated analytically at the very same level of theory to assure that all of the obtained structures correspond to true minima or first-order saddle points (TS) on the potential energy surface. The intrinsic reaction coordinate (IRC) procedure<sup>21,22</sup> was applied to confirm the minima for each TS.

The values of  $\text{pK}_{a,\text{calc}}$  corresponding to various protonation states of each sulfonamide were calculated with the direct

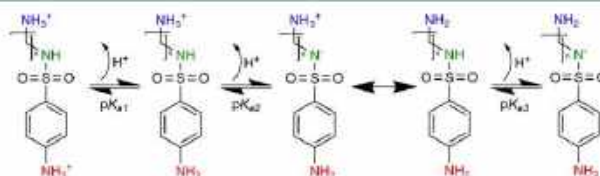


Figure 2. Acid–base equilibria for alkylamine-substituted sulfonamides studied in this paper, where  $n = 2-6$ .

method,<sup>23,24</sup> which employs the use of a thermodynamic cycle presented in Figure 3 below:



Figure 3. Thermodynamic cycle used<sup>23</sup> for the calculation of  $pK_{a,calc}$  according to the direct method. The <sup>g</sup> superscript denotes the condition of 1 atm, whereas the <sup>aq</sup> represents 1 M.

The change of Gibbs free energy of deprotonation ( $\Delta G_{(aq)}^{\ddagger}$ ) was calculated according to eq 1:

$$\Delta G_{(aq)}^{\ddagger} = \Delta G_{(g)}^{\circ} + \Delta G_{(aq)}^{\ddagger}(A^{-}) + \Delta G_{(g)}^{\ddagger}(H^{+}) - \Delta G_{(g)}^{\circ}(HA) + \Delta G^{g-aq} \quad (1)$$

where  $\Delta G_{(g)}^{\circ}(A^{-})$ ,  $\Delta G_{(g)}^{\ddagger}(H^{+})$ , and  $\Delta G_{(g)}^{\circ}(HA)$  are the standard-state solvation free energies of  $A^{-}$ ,  $H^{+}$ , and HA, respectively, and  $\Delta G_{(g)}^{\circ}$  represents the Gibbs free energy of the gas-phase deprotonation of HA:

$$\Delta G_{(g)}^{\circ} = \Delta G_{(g)}^{\circ}(A^{-}) + \Delta G_{(g)}^{\circ}(H^{+}) - \Delta G_{(g)}^{\circ}(HA) \quad (2)$$

The  $\Delta G^{g-aq}$  term guarantees the same standard conditions to both phases, as it converts 1 atm of an ideal gas standard state to an 1 M aqueous standard state. At 298 K, the  $\Delta G^{g-aq}$  assumes the value of 1.89 kcal/mol.<sup>25</sup> Values of  $\Delta G_{(aq)}^{\ddagger}$  were used to calculate  $pK_{a,calc}$  according to the equation:

$$pK_{a,calc} = \frac{\Delta G_{(aq)}^{\ddagger}}{RT \ln 10} \quad (3)$$

Since  $pK_{a,calc}$  values calculated this way tend to deviate from experimental results to some extent, we have decided to also use the approach proposed by Muckerman et al.<sup>26</sup> In this method, a certain number of experimental results is necessary to introduce the  $pK_{a,calc}$  "lift factor" that was obtained here separately for each equilibrium and later on used to correct the computationally determined values:

$$pK_{a,lift} = pK_{a,calc} + \frac{\Delta G_{corr,lift}^{\ddagger}}{RT \ln(10)} \quad (4)$$

where  $\Delta G_{corr,lift}^{\ddagger}$  is a parameter correcting the calculated values of Gibbs free energies based on the results obtained experimentally as described by Muckerman et al.<sup>26</sup>

Muckerman et al. observed<sup>26</sup> that the  $pK_a$  values obtained based on the thermodynamic cycle were poorly reproduced. They claimed that most of the error arose from inaccurate differential solvation free energies of the acid and conjugated base. To eliminate that they proposed in their approach a correction based on the realization that the gas-phase acidities had only a small systematic error relative to the dominant systematic error in the differential solvation. They illustrated the insensitivity of their approach to the functional. Their method could be applied to the comparison of results for sets of neutral acids and protonated amine cationic acids in both aqueous (water) and nonaqueous (acetonitrile) solvents. We have also proven that it worked for pyridine and its N-oxide derivatives in water and acetonitrile.<sup>31</sup>

The hydrophilicity of the sulfa drugs was assessed by the calculation of  $\log P$  values, according to the following equation:<sup>27</sup>

$$\log P = - \left( \frac{G_{n\text{-octanol}} - G_{water}}{2.303RT} \right) \quad (5)$$

In eq 5,  $\Delta G_{n\text{-octanol}}$  and  $\Delta G_{water}$  correspond to the Gibbs free energies of an electrically neutral solute in n-octanol and water. As can be seen from eq 3, the lower the value of  $\log P$ , the more hydrophilic the corresponding solute.

The energies of intramolecular hydrogen bonds ( $E$ ) were assessed using the method proposed by Espinosa et al.,<sup>28</sup> i.e., according to the following equation:

$$E = -1/2V_{BCP} \quad (6)$$

where  $V_{BCP}$  stands for a potential energy density of a Bond Critical Point (BCP) corresponding to the interaction of interest.

The Fuzzy Bond Order (FBO)<sup>29</sup> analysis was performed to assess the degree of covalence of studied hydrogen bonds.<sup>30</sup> In this approach, the bond order is calculated according to the following formula, eq 7:

$$FBO = 2 \sum_{\mu} \sum_{\nu} [ (P^{\alpha} S^A)_{\mu\nu} (P^{\alpha} S^B)_{\nu\mu} + (P^{\beta} S^A)_{\mu\nu} (P^{\beta} S^B)_{\nu\mu} ] \quad (7)$$

In the formula above  $P$  is the density matrix,  $S$  stands for the overlap matrix of basis functions in fuzzy atomic spaces,  $A$  and  $B$  indices represent atoms forming a given bond, and  $\alpha$  and  $\beta$  stand for a spin, where  $\mu$  and  $\nu$  are basis orbitals indices. The concept of "fuzzy" atoms has appeared for the first time in the scientific discourse with the study by Hirshfeld.<sup>31</sup> The mentioned study describes a division of 3D molecular space into atomic regions corresponding to separate atoms having no definitive boundaries, yet being continuously connected. In Mayer's FBO,<sup>32</sup> the fuzzy atomic regions arise from the introduction of a weight function defining the division of a 3D space into "fuzzy" regions.

The biggest value of the error of atomic overlap matrix (AOM) in FBO calculations was found to be equal to 0.00165. Both the QTAIM and FBO analyses were performed using the Multiwfn<sup>33</sup> software.

The final cartesian coordinates of all studied compounds can be found in the Supporting Information (Table S1). All quantum chemical calculations were carried out using the GAUSSIAN09 (Rev.C.01) package.<sup>34</sup>

**Experimental Details of Studies of the NbutylS Compound.** Two sulfonamide derivatives NethylS and NpropylS were physicochemically characterized previously and the results of those studies were published elsewhere.<sup>35</sup> To extend the scope of the experiment, a third N-butylS compound was synthesized, whose characterization has not been published so far. The NbutylS derivative has the longest alkylamino chain and is more basic. Its chain is more flexible than ethyl and propyl derivatives and finally is also more hydrophobic than the remaining two derivatives.

The synthesis of the NbutylS and determination of its  $pK_a$  values were carried out analogously to the procedures described elsewhere.<sup>35</sup> Elemental analysis, nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectrometry (MS), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were used to confirm

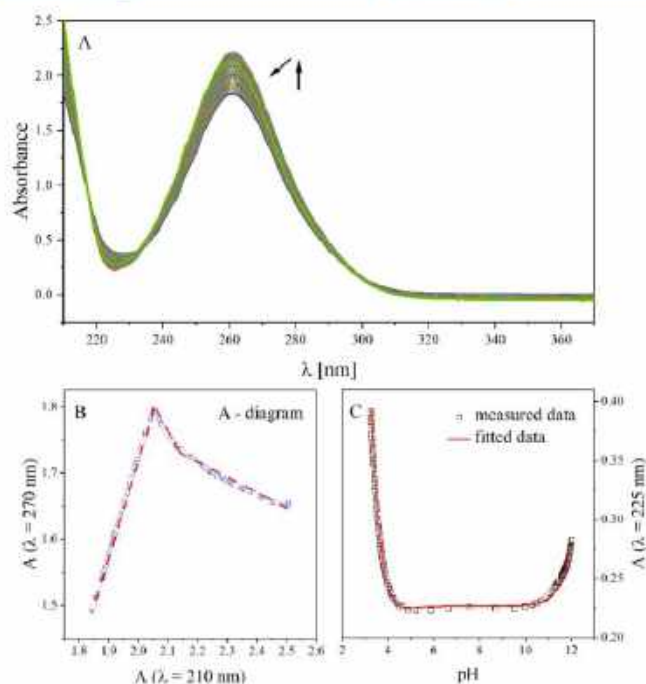


Figure 4. (A) Spectrophotometric acid–base titration curves of NbutylS. The arrows indicate the direction of changes in the intensity of the absorption band. (B) A-diagram presents absorbance change at 270 nm from absorbance change at 210 nm. (C) Absorbance ( $A$ ) of a compound as a function of the pH at  $\lambda = 255$  nm.

Table 1. Wavelengths Maxima ( $\lambda_{max}$ ) and Acid Dissociation Constant ( $pK_a$ ) Values (with Standard Deviation) Determined by the pH-Spectrophotometric Titration Method in Water

$\lambda_{max}$ [nm]	$\lambda_{max}$ [nm] (with acid) <sup>a</sup>	$\lambda_{max}$ [nm] (with alkali) <sup>a</sup>	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$
261	261	260	$1.76 \pm 0.07$	$4.51 \pm 0.14$	$12.28 \pm 0.04$

<sup>a</sup>The values of wavelength maxima in the acidic environment, i.e., the pH before starting the titration process, and in the alkaline environment, i.e., the pH at which the titration was completed, are given.

the structure of the compound, the results of which are presented in the Supporting Information (Figures S2–S4).

The study of the acid–base properties of the compound was performed using pH-spectrometric titration. Acid dissociation constant ( $pK_a$ ) values were calculated with the form of the Henderson–Hasselbach eq 8 implemented into Origin Lab software:

$$A = \frac{A_1 + A_2 \times 10^{(pH-pK_{a1})}}{10^{(pH-pK_{a1})} + 1} + \frac{A_2 + A_3 \times 10^{(pH-pK_{a2})}}{10^{(pH-pK_{a2})} + 1} + \frac{A_3 + A_4 \times 10^{(pH-pK_{a3})}}{10^{(pH-pK_{a3})} + 1} \quad (8)$$

In the graph of the titration process (Figure 4A), spectral changes such as intensity change and hypsochromic shift are observed. From the collected experimental data, an A-diagram (Figure 4B) is plotted which shows the relationship between the absorbance at 270 nm and the absorbance at 210 nm. Based on this, the number of equilibria in the solution for the

analyzed compound was determined. The presence of three equilibria in the solution was proved, as evidenced by the presence of three segments in the A-diagram (Figure 4B) and the same number of absorbance inflections ( $A$ ) as a function of the pH curves (Figure 4C). The calculated  $pK_a$  values of the NbutylS compound are summarized in table (Table 1).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Acid–Base Equilibria.** As mentioned before, the sulfonamides with alkylamine substituents that have been tested here differ structurally in the length of the  $(-CH_2)_n$  chain. Namely, there are compounds with  $n = 2$ –6 methylene groups separating the sulfonamide moiety from the amino group. As experimental results suggested, the deprotonation of particular functional groups of studied sulfonamides should occur in the following order: aromatic amine, sulfonamide, and aliphatic amine at the end.<sup>33</sup> Theoretical calculations shed new insights into the said equilibria. Interestingly, it was found here that for the mentioned order of deprotonation, the calculations of the  $pK_a$  values for the last two equilibria have led to unexpected

results, as the values of  $pK_{a3}$  were calculated to be lower than the corresponding values of  $pK_{a2}$ . A closer examination of the ongoing process has shown that the zwitterion formed after the second deprotonation process (deprotonation of sulfonamide group) may undergo a geometrical rearrangement. Namely, the formation of an intramolecular hydrogen bond between aliphatic amine and deprotonated sulfonamide group and thus closing of the otherwise mobile alkylamine chain may occur (see Figure 5). The formed hydrogen bond may be regarded as a clasp bringing about a second cycle in the molecule.

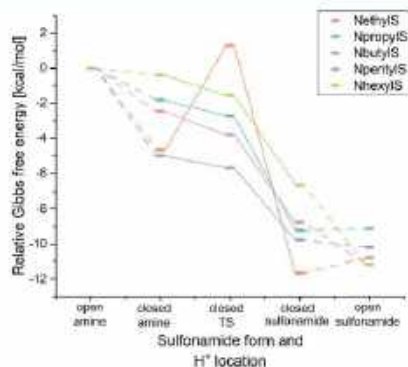


Figure 5. Relative Gibbs free energies of the electrically neutral forms of the studied sulfonamides.

As is evident from Figure 5, the formation of an intramolecular hydrogen bond, and thus the ‘closing’ of sulfonamide is favored thermodynamically regardless of the system considered. In the next step, the acidic proton may be transferred from the alkylamine to the sulfonamide group. This process is expected to be thermodynamically barrierless for each of the studied sulfonamides but NethylS. For NethylS, the barrier was calculated to be equal to 5.9 kcal/mol, which suggests that it may easily occur in standard conditions. The reasons for the existence of the proton transfer barrier in NethylS are discussed in the succeeding part of the manuscript. The analyzed proton transfer leads to the regeneration of the protonated sulfonamide group. The considered structures, in which the N atom of the sulfonamide group acts as a hydrogen bond donor whereas that of the alkylamine groups is an acceptor, are described by lower values of Gibbs free energy than any other structure hitherto discussed. It is important to

realize, however, that the situation may be different in a real solution, especially in the case of polar solvents, where the zwitterionic form (see Figure S1) may be favored. To get a complete picture of the occurring processes, the straightening of the thus-obtained alkylamine chain (and thus breaking of intramolecular hydrogen bonds) was also investigated. As is evident from Figure 5, the unfolding of the alkylamine chains is favored thermodynamically for all but two of the studied compounds, i.e., NethylS and NpropylS. For the remaining cases, strain energy coming from the bending of the alkylamine chain to form a hydrogen bond (and thus close the sulfonamide) is higher than that of the formed hydrogen bond. Nonetheless, the rather insignificant differences in Gibbs free energies for closed and opened forms of sulfonamides with  $H^+$  on the sulfonamide group indicate that in standard conditions, both forms are likely to be present. As can be seen in Figure 5, undoubtedly, the most favorable form of the neutral sulfonamides studied here is one with acidic  $H$  on the sulfonamide group, regardless of whether it is closed by the hydrogen bond or not. The exemplary structures of various forms of neutral sulfonamides are presented in Figure S1.

Bearing all of the above in mind, we propose the following deprotonation order: aromatic amine, sulfonamide deprotonation followed by an acidic  $H$  transfer from alkylamine to the sulfonamide group, and second deprotonation of sulfonamide (see Figure 2).

The values of  $pK_a$  corresponding to successive deprotonation steps are shown in Table 2. As can be seen from the said table, the values of  $pK_a$  calculated from the thermodynamic cycle (Figure 3) differ significantly from those determined experimentally. The differences are most evident for the first and last steps of deprotonation. The disparities presumably arise from the insufficient inclusion of solvent effects in the SCRF calculations. The application of the method proposed by Muckerman allows for a significant improvement in the results.<sup>20</sup>

An analysis of the  $pK_{a1}$  allows to conclude that elongation of the alkylamine chain leads to the increase in the acidity of the aromatic amine group. The effect, however, is rather limited, which is of no surprise bearing in mind the distance separating the two functional groups in question. For the second step of deprotonation, i.e.,  $pK_{a2}$ , the results of theoretical calculations seem to show a different trend than experimental ones. Namely, according to calculations, values of  $pK_{a2}$  should increase with the length of the alkylamine chain. Whereas experimental results (for which the available data are limited to three compounds) exhibit the opposite tendency. The  $pK_{a3}$  values corresponding to NbutylS are an exception in both approaches, as they are determined to be equal to  $\sim 4.5$  as

Table 2.  $pK_a$  Values Calculated for the Studied Compounds<sup>a†</sup>

system	$pK_{a1,calc}$	$pK_{a1,exp}$	$pK_{a2,calc}$	$pK_{a2,exp}$	$pK_{a3,calc}$	$pK_{a3,exp}$	$pK_{a4,calc}$	$pK_{a4,exp}$	$pK_{a5,calc}$	$pK_{a5,exp}$
NethylS	-4.77	2.58	$2.62 \pm 0.19^b$	8.15	6.14	$6.45 \pm 0.21^b$	18.29	12.07	$9.67 \pm 0.08^b$	
NpropylS	-4.35	2.27	$2.11 \pm 0.10^b$	8.78	6.68	$6.35 \pm 0.06^b$	14.92	9.41	$10.86 \pm 0.19^b$	
NbutylS	-4.42	1.70	$1.76 \pm 0.07^b$	8.32	4.49	$4.51 \pm 0.14^c$	17.16	11.33	$12.28 \pm 0.04^c$	
NpentylS	-4.39	1.75	$1.76^d$	8.36	6.88	$6.79^d$	17.20	10.45		
NhexylS	-5.90	1.14	$1.19^d$	11.72	8.24	$8.04^d$	16.91	10.33		

<sup>a</sup>Values marked by *calc* in subscript come from the thermodynamic cycle-based calculations, whereas those marked with *exp* were obtained with the use of Muckerman's approach.<sup>20</sup> Experimental results are designated with *exp*, and their standard deviations are also provided. <sup>b</sup>Values from ref 32. <sup>c</sup>Values obtained in this work. <sup>d</sup>Values extrapolated from eqs 9 and 10. <sup>e</sup>Values are indeterminable due to the low correlation between  $pK_{a3,exp}$  and  $pK_{a4,calc}$ .

opposed to  $\sim 6.5$  observed for remaining sulfonamides. This is likely due to the fact that for singly deprotonated (via aromatic amino group) NbutylS, there is a stabilizing intramolecular hydrogen bond between the  $-\text{NH}_2^+$  alkylamine group and the O atom of the sulfonamide moiety. A shift of the electron density from the sulfonamide group to the H atom of the alkylamine group leads to the increase of the acidity of the first, rendering the  $\text{p}K_{\text{a}2}$  of NbutylS almost two units lower than that of remaining sulfonamides. Additionally, the product of the said deprotonation is also stabilized by the strongest of hydrogen bonds studied here. For the last step of deprotonation, i.e.,  $\text{p}K_{\text{a}3}$  calculations, and experiment again show the opposite trend. Namely, calculations suggest that the values of  $\text{p}K_{\text{a}3}$  should be expected to decrease with the increasing number of methylene groups in the alkyl chain, whereas the experiment shows an increase from 9.67 to 12.28 while going from NethylS to NbutylS. As mentioned earlier, the discrepancies between theoretical and experimental results arise from insufficient inclusion of solvent effects. The other important factor that stands in the way of obtaining accurate values of  $\text{p}K_{\text{a}}$  with the use of theoretical methods is the omission of the presence and thus influence of various forms of compounds in a real solution. By definition, the  $\text{p}K_{\text{a}}$  is calculated using only two equilibrium structures, one of the acid and second of the conjugate base. However, it is worth adding that in a real solution, compounds appearing as various conformers (or isomers) are present. Therefore, a hypothetical theoretical model that accurately predicts the values of  $\text{p}K_{\text{a}}$  would necessarily need to account for all types of systems present in the solution. The obtained values of  $\text{p}K_{\text{a}1,\text{th}}$  and available data on  $\text{p}K_{\text{a}1,\text{exp}}$  were used to assess the  $\text{p}K_{\text{a}1,\text{exp}}$  (eq 9) and  $\text{p}K_{\text{a}2,\text{exp}}$  (eq 10) values for NpentylS and NhexylS. The values of  $\text{p}K_{\text{a}3,\text{exp}}$  could not be determined in the same manner, as the correlation between  $\text{p}K_{\text{a}3,\text{th}}$  and  $\text{p}K_{\text{a}3,\text{exp}}$  is rather limited.

$$\text{p}K_{\text{a}1,\text{exp}} = 0.9322\text{p}K_{\text{a}1,\text{th}} + 0.1279 \quad R^2 = 0.9258 \quad (9)$$

$$\text{p}K_{\text{a}2,\text{exp}} = 0.9189\text{p}K_{\text{a}2,\text{th}} + 0.4681 \quad R^2 = 0.9211 \quad (10)$$

Our calculations suggest that the  $\text{p}K_{\text{a}1,\text{exp}}$  of NpentylS should be close to that of NbutylS, whereas that of NhexylS might be as low as 1.19. As for the  $\text{p}K_{\text{a}2,\text{exp}}$  values, the values for NpentylS and NhexylS were calculated to be equal to 6.79 and 8.04 respectively, indicating a decreasing acidic strength of the corresponding sulfonamide group.

Following Muckerman's claim, we might conclude that the methodology allows to generally predict  $\text{p}K_{\text{a}}$  values for all the cases investigated within 1  $\text{p}K_{\text{a}}$  unit (this is also observed in our case for  $\text{p}K_{\text{a}1}$  and  $\text{p}K_{\text{a}2}$ ) as the differential solvation error is larger than the systematic error in the gas-phase acidity calculations. Oppositely,  $\text{p}K_{\text{a}3}$  differs by more than 1  $\text{p}K_{\text{a}}$  unit from those experimental, suggesting that the systematic error in the gas-phase acidity calculations dominates.

**Intramolecular Hydrogen Bonds.** As mentioned in the previous paragraph, alkylamine and sulfonamide groups can form an intramolecular hydrogen bond leading to a closure of the otherwise mobile alkylamine chain. Due to the fact, that the nonzwitterionic form of the electrically neutral sulfonamides is lower in energy than its zwitterionic form (Figure S1), the first one of each studied sulfonamide was subjected to a detailed examination. It is apparent from Table 3 that the

**Table 3.** H-Bond Distances (in Å), Angles (in deg), Energies (in kcal/mol), and FBO in Closed Electrically Neutral Form of Sulfonamides

system	$d(\text{D}-\text{H})$	$d(\text{H}\cdots\text{A})$	$d(\text{D}\cdots\text{A})$	$\angle(\text{DHA})$	E	FBO <sup>a</sup>
NethylS	1.022	2.392	2.855	106.4	— <sup>b</sup>	— <sup>b</sup>
NpropylS	1.028	2.066	2.877	134.0	5.08	0.080
NbutylS	1.040	1.846	2.842	159.3	9.16	0.124
NpentylS	1.036	1.948	2.966	167.0	6.55	0.101
NhexylS	1.036	1.964	2.999	177.5	6.16	0.102

<sup>a</sup>Dimensionless. <sup>b</sup>Values could not be determined.

strongest hydrogen bond is formed for NbutylS, whereas the weakest interaction was calculated for NethylS. For NethylS, the shortest D–H (1.022 Å), the longest H⋯A (2.392 Å), and the smallest values of the  $\angle(\text{DHA})$  dihedral angle (106.4 deg) are observed. Because of the said geometrical limitations, the formed hydrogen bond is so weak that it cannot be detected via topology of electron density analysis, as no bond critical points are associated with the interaction. The situation is analogous in the case of PBO analysis.

NbutylS is on the other side of the energetic spectrum, as the energy calculated for H-bond is equal to 9.16 kcal/mol. The H-bond of NbutylS is characterized by the lowest value of H⋯A (1.846 Å) and the highest value of the D–H bond length (1.040 Å) of all studied compounds. Additionally, the value of FBO is equal to 0.124, which is ca 22% higher than the one corresponding to the H-bond with the second highest FBO calculated for NethylS. In the case of the discussed compound, the formation of an intramolecular H-bond leads to the creation of a 7-membered ring (Figure S1), made out of NH⋯N and four C atoms. Both values of E and FBO indicate that for NbutylS, the energy of the H-bond surpasses the one arising from the alkylamine chain strain by the greatest margin.

Naturally, the H-bonds corresponding to remaining sulfonamides are described by values in-between these mentioned earlier. Namely, the hydrogen bond lengths vary from 1.964 to 2.066 Å, and the energies change from 5.08 to 6.55 kcal/mol, whereas FBO takes values from 0.080 to 0.102. The general trend that can be noticed is that the strength of the H-bond interaction increases from  $n = 2$  to  $n = 4$  and then decreases with the elongation of the alkylamine chain.

**Hydrophobicity.** As mentioned earlier, hydrophobicity is an important parameter describing biologically active compounds. As shown in Table 4, values of  $\log P$  theoretically

**Table 4.** Calculated Values of  $\log P$  for Closed and Open (in Parentheses) Forms of Nonzwitterionic Sulfonamides

system	$\log P$
NethylS	−3.76 (−4.23)
NpropylS	−3.15 (−3.56)
NbutylS	−0.94 (−2.65)
NpentylS	0.10 (−3.12)
NhexylS	1.53 (−1.49)

obtained were collected. As anticipated, the hydrophobicity of the studied compounds increases with the number of carbon atoms in the alkylamine chain. Furthermore, the relaxation of the alkylamine chain (preceded by the breaking of the H-bond) leads to a decrease in hydrophobicity. The said decrease seems to be to some extent proportional to the length of the

alkylamine chain, as for NethylS, it is only 0.47 and for NhexylS, it is as big as 3.02 units.

According to Lipinski's rule of five,<sup>36</sup> an orally active compound has a log *P* value not exceeding 5. As such, all compounds studied here may be regarded as orally active. The situation is somewhat different when considering the Ghose filter,<sup>37</sup> according to which druglike compounds should be characterized by log *P* values in the range of -0.4 to 5.6. In light of that, only NpentylS and NhexylS in a closed form can be regarded as druglike.

## CONCLUSIONS

This study has investigated the set of alkylamine-substituted sulfonamides with potential biological activity with the use of computational methods. Taken together, we defined the following theses:

- (i) The studied sulfonamides exist in forms differing in the presence (or absence) of intramolecular hydrogen bonds;
- (ii) Electrically neutral sulfonamides may exist in zwitterionic and nonzwitterionic forms, whereby the latter is thermodynamically favored.
- (iii) Proton transfer that is associated with zwitterionic to nonzwitterionic form transition is expected to be a barrierless process;
- (iv) The calculated values of *pK<sub>a</sub>* significantly differ from those obtained experimentally. It is the application of Muckerman's approach that renders the theoretical findings regarding acid–base properties meaningful;
- (v) For electrically neutral forms of studied sulfonamides, the strongest H-bond is present in NbutylS, whereas that of NethylS is on the other side of the spectrum;
- (vi) The hydrophobicity of studied systems increases along with the length of the alkylamine chain. The formation of intramolecular H-bonds also leads to an increase in hydrophobicity.

Our studies provide a solid basis and provide a lot of information that can be used in the design of new drugs. They explain the behavior of molecules in the aquatic environment, which allows conclusions to be drawn about their behavior in the cell. The presence of intramolecular hydrogen bonds in the structure of sulfonamide derivatives may cause differences in the mechanism of interaction of the compound with biomolecules, compared to molecules in which this bond does not occur. The determined *pK<sub>a</sub>* values of the compounds allow one to determine in which protolytic form the sulfonamide will occur in the cell, at physiological pH. The calculated bond strengths within the analyzed molecules may also affect the mechanism of interaction of the compound with biomolecules. In addition, they may affect the complexing properties of the discussed sulfonamides with biologically significant metal ions, the combinations of which may also find potential use in pharmaceuticals. The specific hydrophobicity of the compounds suggests whether they are capable to penetrate biological membranes and also whether they will be excreted through the kidneys. This is a very important aspect considered when designing new pharmaceuticals because the journey of a drug molecule from the site of administration to the site of action is complex and involves many changes in the environment. In conclusion, the conducted research provides information useful for understanding the behavior of molecules

and is the basis for further computational, experimental, and biological studies.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcb.3c01965>.

Cartesian coordinates of the calculated equilibrium structures of all studied compounds in water (SMD) together with the corresponding values of electronic and Gibbs free energies; equilibrium structures of various forms of zwitterions sulfonamides; mass spectrum for NbutylS; FT-IR spectra for NbutylS; and <sup>1</sup>H NMR spectra for NbutylS (PDF)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

Mariusz Makowski – Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, 80-308 Gdańsk, Poland; [orcid.org/0000-0002-7342-722X](https://orcid.org/0000-0002-7342-722X); Email: [mariusz.makowski@ug.edu.pl](mailto:mariusz.makowski@ug.edu.pl)

### Authors

Jakub Brzeski – Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, 80-308 Gdańsk, Poland; [orcid.org/0000-0003-4865-0152](https://orcid.org/0000-0003-4865-0152)

Aleksandra Ciesielska – Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, 80-308 Gdańsk, Poland

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jpcb.3c01965>

### Author Contributions

J.B.: conceptualization in part of computational studies, writing a significant part of the original draft; A.C.: conceptualization in part of experimental studies of the NbutylS compound, and writing a part of the original draft in this regard; M.M.: conceptualization, supervision, fund acquisition, writing a part of the original draft. All authors have edited, reviewed, corrected, and accepted the final version of the article.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Polish National Science Centre (NCN) under a grant UMO-2019/33/B/ST4/00031. The calculations have been carried out using resources provided by Wrocław Centre for Networking and Supercomputing (<http://wcss.pl>) grant No. 560. The authors would like to thank Prof. Agnieszka Chylewska for the valuable discussion on the possible *pK<sub>a</sub>* equilibria in the systems studied.

## REFERENCES

- (1) Roof, A.; Tanyeli, C. Bioactive Thiazole and Benzothiazole Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 911–927.
- (2) Fukuioka, K.; Usuda, J.; Iwamoto, Y.; Fukumoto, H.; Nakamura, T.; Yoneda, T.; Narita, N.; Saijo, N.; Nishio, K. Mechanisms of Action of the Novel Sulfonamide Anticancer Agent E7070 on Cell Cycle Progression in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Invest. New Drugs* **2001**, *19*, 219–227.
- (3) Shen, C.-H.; Wang, Y.-F.; Kowalevsky, A. Y.; Harrison, R. W.; Weber, I. T. Amprenavir Complexes with HIV-1 Protease and Its Drug-Resistant Mutants Altering Hydrophobic Clusters. *FEBS J.* **2010**, *277*, 3699–3714.

- (4) Lunestad, B. T.; Samuelsen, O. Veterinary Drug Use in Aquaculture. In *Improving Farmed Fish Quality and Safety*; Woodhead Publishing: Cambridge, England, 2008; pp 97–127; DOI: 10.1533/9781845694920.197.
- (5) Hall, W. H.; Spink, W. W. Sulfamerazine. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* **1943**, *123*, 125.
- (6) Roblin, R. O.; Williams, J. H.; Wirnek, P. S.; English, J. P. Chemotherapy. II. Some Sulfanilamido Heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 2002–2005.
- (7) Cardones, A. R. G.; Hall, R. P. Management of Dermatitis Herpetiformis. *Dermatol. Clin.* **2011**, *29*, 631–635.
- (8) Young, R. J. Physical Properties in Drug Design. In *Tactics in Contemporary Drug Design*; Meanwell, N. A., Ed.; Topics in Medicinal Chemistry; Springer: Berlin, Heidelberg, 2015; Vol. 9, pp 1–68; DOI: 10.1007/978-3-642-55041-6.
- (9) *Outpatient Antibiotic Prescriptions - United States*; Centers for Disease Control and Prevention, 2020. <https://www.cdc.gov/>.
- (10) Skögl, O. Sulfonamide Resistance: Mechanisms and Trends. *Drug Resistance Updates* **2000**, *3*, 155–160.
- (11) Knowles, S.; Shapiro, L.; Shear, N. H. Should Celecoxib Be Contraindicated in Patients Who Are Allergic to Sulfonamides? *Drug Saf.* **2001**, *24*, 239–247.
- (12) Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *P&T* **2015**, *40*, 277–283.
- (13) Friedland, J. S. Tuberculosis and Other Mycobacterial Infections. In *Infectious Diseases*; Elsevier, 2010; pp 309–327. London, UK; DOI: 10.1016/B978-0-323-04579-7.00030-7.
- (14) Nuhoglu, Y.; Nuhoglu, C. Aminophylline for Treating Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Expert Rev. Respir. Med.* **2008**, *2*, 305–313.
- (15) Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. Chiral Drugs: An Overview. *Int. J. Biomed. Sci.* **2006**, *2*, 85–100.
- (16) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. The M06 Suite of Density Functionals for Main Group Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, Noncovalent Interactions, Excited States, and Transition Elements: Two New Functionals and Systematic Testing of Four M06-Class Functionals and 12 Other Function. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215–241.
- (17) Krishnan, R.; Binkley, J. S.; Seeger, R.; Pople, J. A. Self-consistent Molecular Orbital Methods. XX. A Basis Set for Correlated Wave Functions. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 650–654.
- (18) Clark, T.; Chandrasekhar, J.; Spitznagel, G. W.; Schleyer, P. V. R. Efficient Diffuse Function-Augmented Basis Sets for Anion Calculations. III. The 3-21+G Basis Set for First-Row Elements, Li–F. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 294–301.
- (19) Miertuš, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. Electrostatic Interaction of a Solute with a Continuum. A Direct Utilization of AB Initio Molecular Potentials for the Prediction of Solvent Effects. *Chem. Phys.* **1981**, *55*, 117–129.
- (20) Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378–6396.
- (21) Fukui, K. The Path of Chemical Reactions - the IRC Approach. *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*, 363–368.
- (22) Hratchian, H. P.; Schlegel, H. B. Accurate Reaction Paths Using a Hessian Based Predictor–Corrector Integrator. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 9918–9924.
- (23) Zeng, Q.; Jones, M. R.; Brooks, B. R. Absolute and Relative pKa Predictions via a DFT Approach Applied to the SAMPL6 Blind Challenge. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2018**, *32*, 1179–1189.
- (24) Mech, P.; Bogunia, M.; Nowacki, A.; Makowski, M. Calculations of pKa Values of Selected Pyridinium and Its N-Oxide Ions in Water and Acetonitrile. *J. Phys. Chem. A* **2020**, *124*, 538–551.
- (25) Alongi, K.; Shields, G. Theoretical Calculations of Acid Dissociation Constants: A Review Article. *Annu. Rep. Comput. Chem.* **2010**, *6*, 113–138.
- (26) Muckerman, J. T.; Skone, J. H.; Ning, M.; Wasada-Tsutsui, Y. Toward the Accurate Calculation of pKa Values in Water and Acetonitrile. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2013**, *1827*, 882–891.
- (27) Ciura, K.; Fedorowicz, J.; Andrić, E.; Zuvela, P.; Greber, K. E.; Baranowski, P.; Kawczak, P.; Nowakowska, J.; Bączek, T.; Sączewski, J. Lipophilicity Determination of Antifungal Isoniazole[3,4-b]Pyridin-3(1H)-Ones and Their N1-Substituted Derivatives with Chromatographic and Computational Methods. *Molecules* **2019**, *24*, 4311.
- (28) Espinosa, E.; Molins, E.; Lecomte, C. Hydrogen Bond Strengths Revealed by Topological Analyses of Experimentally Observed Electron Densities. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *285*, 170–173.
- (29) Salvador, P.; Mayer, I. Energy Partitioning for “Fuzzy” Atoms. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, S046–S052.
- (30) Lepetit, C.; Vabre, B.; Canac, Y.; Alikhani, M. E.; Zargarian, D. Pentacoordinated, Square Pyramidal Cationic PCP Ni(II) Pincer Complexes: ELF and QTAIM Topological Analyses of Nickel–Triflate Interactions. *Theor. Chem. Acc.* **2018**, *137*, 141.
- (31) Hirshfeld, F. L. Bonded-Atom Fragments for Describing Molecular Charge Densities. *Theor. Chim. Acta* **1977**, *44*, 129–138.
- (32) Mayer, I.; Salvador, P. Overlap Populations, Bond Orders and Valences for ‘Fuzzy’ Atoms. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *383*, 368–375.
- (33) Lu, T.; Chen, F. Multiwfn: A Multifunctional Wavefunction Analyzer. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, 580–592.
- (34) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A; et al. *Gaussian09 Revision D01*; Gaussian Inc.: Wallingford, CT; 2010.
- (35) Ciesielska, A.; Gawrońska, M.; Makowski, M.; Ramotowska, S. Sulfonamides Differing in the Alkylamino Substituent Length – Synthesis, Electrochemical Characteristic, Acid-Base Profile and Complexation Properties. *Polyhedron* **2022**, *221*, No. 115868.
- (36) Lipinski, C. A. Lead- and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discovery Today Technol.* **2004**, *1*, 337–341.
- (37) Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. I. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 55–68.





Contents lists available at ScienceDirect  
**Spectrochimica Acta Part A:**  
**Molecular and Biomolecular Spectroscopy**  
 journal homepage: [www.elsevier.com/locate/spectrochimica-acta-part-a](http://www.elsevier.com/locate/spectrochimica-acta-part-a)  
[www.elsevier.com/locate/spectrochimica-acta-part-a](http://www.elsevier.com/locate/spectrochimica-acta-part-a)



## Exploring the interaction of biologically active compounds with DNA through the application of the SwitchSense technique, UV–Vis spectroscopy, and computational methods

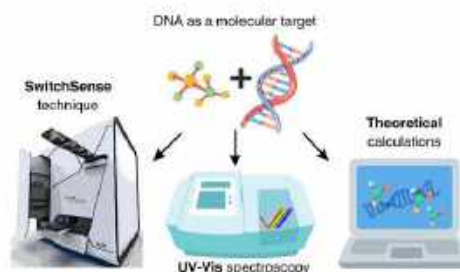
Aleksandra Ciesielska, Jakub Brzeski, Dorota Zarzecka, Magdalena Stasiuk, Mariusz Makowski\*, Sandra Brzeska

Faculty of Chemistry, University of Olsztyn, Wite Stwosa 63, 80-308 Olsztyn, Poland

### HIGHLIGHTS

- A multi-tool approach to study bioactive analyte-DNA interactions.
- Assessment of bioactivity representatives of three groups of compounds towards DNA.
- Determination of association and dissociation kinetics with switchSense technique.
- SwitchSense results don't exhibit correlation between process flow and binding mode.
- Studied analytes differ significantly in the kinetic parameters of interaction.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
 Interaction with biomolecules  
 DNA  
 Bioactive compounds  
 SwitchSense technique  
 Computational studies  
 UV-Vis spectrophotometry

### ABSTRACT

DNA is a key target for anticancer and antimicrobial drugs. Assessing the bioactivity of compounds involves *in silico* and instrumental studies to determine their affinity for biomolecules like DNA. This study explores the potential of the switchSense technique in rapidly evaluating compound bioactivity towards DNA. By combining switchSense with computational methods and UV-Vis spectrophotometry, various bioactive compounds' interactions with DNA were analyzed. The objects of the study were: netropsin (as a model compound that binds in the helical groove), as well as derivatives of pyrazine (PTCA), sulfonamide (NbutylS), and anthraquinone (AQ-NetOH). Though no direct correlation was found between switchSense kinetics and binding modes, this research suggests the technique's broader utility in assessing new compounds' interactions with DNA, used as analytes whose interactions with DNA have not been yet fully described in the literature.

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [mariusz.makowski@ug.edu.pl](mailto:mariusz.makowski@ug.edu.pl) (M. Makowski), [sandra.brzeska@ug.edu.pl](mailto:sandra.brzeska@ug.edu.pl) (S. Brzeska).

<https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.124313>

Received 11 March 2024; Received in revised form 12 April 2024; Accepted 17 April 2024

Available online 19 April 2024

1386-1425/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Currently, drug resistance poses a significant global challenge [1–4], leading to treatment inefficacy and increased healthcare costs. Examples include methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [5–7], multidrug-resistant tuberculosis [8–10], and drug-resistant strains of malaria and HIV [11–13]. To combat this, prudent antibiotic use and the development of new treatments are essential [14–17]. Target-based drug discovery, which identifies specific molecular targets for drug interaction, is a key approach [18–21].

Molecular targets, such as DNA, play vital roles in medication efficacy [22–25]. Understanding a compound's affinity for DNA and its mechanism of action is crucial [26–32]. Traditional methods for assessing this have limitations. An intriguing alternative is switchSense technology [33–36], which allows real-time investigation of molecular interactions without additional labeling.

This study employs a combination of experimental and computational techniques to elucidate how selected compounds interact with DNA. It demonstrates the potential of switchSense in evaluating the bioactivity of new compounds towards DNA by characterizing affinity, determining association/dissociation rates and constants, discussing binding modes and sites, and comparing findings with other methods [33–36].

Representatives of three important groups of biologically active compounds were selected for research. Namely: pyrazines, sulfonamides and anthraquinones. Derivatives of pyrazine are known for their wide application in medicine and biotechnology due to their antifungal, antibacterial, antiviral, and anticancer properties [37–40]. One of the best-known pyrazine drugs is pyriminamide (PZA) used in the first phase of tuberculosis treatment [41]. Sulfonamides are a well-known class of antibiotics. They are used to treat many bacterial diseases causing eye infections, nocardiosis, and urinary tract infections. Further alterations to the sulfonamide group enable broadening of their biological efficacy, encompassing antifungal, anti-inflammatory, anticancer, and antiviral properties [42–46]. Anthraquinones are a group of compounds based on the anthracene-9,10-dione skeleton well known for their use as pigments in the textile [47–49] and food [50,51] industries. Moreover, they have been used in molecular recognition systems as various types of chemosensors, indicators, and elements of biochips [52–57]. Above the others, however, they show a wide biological activity, which is why they have been used in pharmacotherapy for years. Anthraquinone derivatives are mainly known for their anti-cancer properties [58].

The rationale for utilizing the switchSense technique in evaluating the bioactivity of new compounds towards DNA is demonstrated in this paper by: (i) characterizing the affinity of the studied molecules for a chosen DNA double-strand sequence; (ii) determining parameters such as the association/dissociation rates and constants for the molecule-DNA adduct; (iii) discussing the possible mode and binding sites of the studied molecules to the specific base pair sequence employed in this investigation; and (iv) comparing the findings obtained using the switchSense technique with those obtained from other experimental including also theoretical methods, where applicable.

## 2. Experimental section

### 2.1. Reagents

The netropsin dihydrochloride (NET) from *Streptomyces netropsis*, ( $\geq 98$  % purity) was purchased from a commercial source (Sigma-Aldrich) and used without further purification. The pyrazine-2-thiocarboxamide (PTCA), of analytical purity grade ( $\geq 97$  %), was purchased from a commercial source (Sigma-Aldrich), and the compound was recrystallized according to the procedure described earlier [59]. The sulfonamide derivative (NbutylS) – was synthesized with the use of the procedure described elsewhere in detail [60]. Anthraquinone derivative, 1-(2-hydroxyethylamino)-anthracene-9,10-dione, (AQ-NetOH)

was synthesized according to the procedure described by Krapcho and Shaw [61].

### 2.2. SwitchSense measurements

Some steps such as standardization and measuring system of a DNA with the fluorophore attached in the switchSense measurements are repeatable. The whole procedure of SwitchSense measurements was described in our previous paper [33] in detail. Concentrations were selected taking into account the solubility of the studied compounds and the intensity of signal changes during the experiment, determined in the preliminary measurements i.e.: the NET from  $2 \cdot 10^{-4}$  to  $1.25 \cdot 10^{-5}$  M; the PTCA and NbutylS from  $8 \cdot 10^{-4}$  to  $5 \cdot 10^{-3}$  M; the AQ-NetOH from  $2 \cdot 10^{-3}$  to  $1.25 \cdot 10^{-5}$  M.

Based on the results of standardization the experiments were conducted in the kinetic static mode, which was chosen based on our prior research [33] and initial measurements in this work. The association (A) and dissociation (D) times for kinetics analysis were individually determined for each analyte based on preliminary measurements, resulting in the following values: A = 30 s, D = 60 s for NET and AQ-NetOH, A = 120 s, D = 240 s for PTCA, and A = 240 s, D = 480 s for NbutylS. Various concentrations of the tested compound were employed in the analysis. Prior to and following each concentration series, a blank (buffer solution) was conducted. The flow rate during the experiments was set at 200  $\mu\text{L/s}$ , except for NbutylS, where the flow rate was 100  $\mu\text{L/s}$  during the association phase. All measurements were recorded at three different temperatures; 25, 30, and 37 °C. The status and parameters of the used chips were verified using the chip test procedure provided by the manufacturers before and after each measurement. The results of each experiment were then quantitatively analyzed as described previously [33].

The solvent used for studies using the switchSense technique is a selected buffer (e.g. Tris buffer or phosphate buffer) with physiological pH and specific ionic strength. Hence the reaction medium is highly polar. When the static mode is used for research, there are no changes in the potential of the gold electrode functionalized with DNA fragments. The switchSense technique does not determine or verify the polarizability of the solvent (nor the tested ligands), which is one of the factors that influences the binding of the ligand to the biomacromolecule. In the switchSense technique, we can determine the concentration of the adapter solution, i.e. the DNA strand used to functionalize the chip surface. In addition, we control the concentration of the analyte that is introduced into the measurement system for analysis. However, there is no possibility to determine the concentration of the ligand bound to the DNA strand, because it depends on several factors, including the effectiveness of functionalization of the chip surface used for the research. Moreover, studies performed using the switchSense technique are conducted in flow, not in equilibrium in solution.

### 2.3. Computational studies

The equilibrium structures of all studied compounds were established using the wB97XD density functional [62] together with triple zeta Pople-type 6-311++G(2d,2p) basis set [63,64]. The solvent effects were approximated employing the SMD solvation model [65] designed in Truhlar's group. For the NbutylS system, it was known that there are two important conformations, namely the one without (no-HB) and one with (HB) an intramolecular hydrogen bond connecting the alkylamine group with the sulfonamide moiety. Hence both of them were subjected to analysis. The optimized structures were then subjected to vibrational frequency analysis to confirm the nature of calculated stationary points. The equilibrium structures expressed as cartesian coordinates together with corresponding electron energies (E), enthalpies (H), and Gibbs free energies (G) of all studied compounds can be found in the [Supplementary Materials \(Table S1\)](#). All quantum chemical calculations were performed using the GAUSSIAN16 (Rev. C.01) package [66].

The structure of the receptor DNA helix was obtained from our previous work [33]. In short, the NAB (Nucleic Acid Builder) [67] was used to build an initial structure of the receptor based on the DNA helix sequence provided by the products of the Helix instrument. Thus obtained system was subjected to an MD simulation employing an OL15 force field [68] within the AMBER14 computational package [69]. A detailed description of the methodology for receptor structure determination can be found here [33].

To gain insight into how the studied analytes might interact with the DNA helix under investigation, molecular docking simulations were conducted using AutoDock 4.2 (Rev. 4.2.6) software [70]. The receptor helix and ligand structures lacking nonpolar hydrogen atoms were utilized during these simulations. Gasteiger partial charges [71] were computed for the aforementioned structures and subsequently employed in the docking calculations. Given the unknown binding modes for the systems in question, it was necessary to conduct docking simulations in two steps. Initially, a less precise docking approach was employed with a large grid box ( $96 \times 126 \times 98 \text{ \AA}^3$ ) and a somewhat spacious  $1 \text{ \AA}$  grid point spacing, encompassing the entire DNA strand to identify the most favorable binding sites. Subsequently, more precise calculations were performed using grid boxes that solely covered the most significant binding sites, employing a  $0.303 \text{ \AA}$  grid point spacing to yield more accurate results. The binding energy between the analyte and receptor is calculated according to the following equation:

$$\Delta G = \left( V_{(bound)}^{A-A} - V_{(unbound)}^{A-A} \right) + \left( V_{(bound)}^{R-R} - V_{(unbound)}^{R-R} \right) + \left( V_{(bound)}^{A-R} - V_{(unbound)}^{A-R} + \Delta S_{conf} \right) \quad (1)$$

where A stands for the “analyte”, R stands for the receptor and  $\Delta S_{conf}$  accounts for the conformational entropy lost upon binding.

The inhibition constant ( $K_i$ ) is calculated using the binding energy ( $\Delta G$ ) according to the formula:

$$K_i = \exp\left(\frac{\Delta G}{RT}\right) \quad (2)$$

where  $T$  is the temperature (298.15 K) and  $R$  is the universal gas constant ( $1.985 \cdot 10^{-3} \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ).

It is important to realize, however, that as good as the AutoDock suite is, it does not allow for a precise description of processes occurring during the interaction of analytes with the receptor. Namely, it is not possible to observe an intercalation of analyte molecules between nucleobase pairs within the AutoDock suite. There are two main reasons for this. Firstly, the software only implements an implicit solvation model, which does not accurately capture hydrophobic interactions that often play a role in intercalation between nucleobase pairs. Secondly, the receptor is typically treated as a rigid entity due to limitations in the flexibility of calculations. In rigid calculations, however, there is no physical space between two neighboring rigid nucleobases for a potential analyte to intercalate. Nonetheless, it is important to realize that AutoDock gives rather reliable results when it comes to interaction via minor and major grooves.

#### 2.4. Spectrophotometric titrations

Spectrophotometric analyses were conducted using a Perkin Elmer Lambda 650 UV-Vis spectrophotometer. Spectra were recorded within the wavelength range of 200 to 700 nm using a 1 cm quartz cuvette. A Tris/HCl buffer with a pH of 7.4 served as the reference solution. The DNA solution was prepared by diluting *Calif thymus* DNA (CT-DNA) acquired from Sigma-Aldrich in Tris/HCl buffer (pH 7.4) obtained from Dynamic Biosensors GmbH. The DNA concentration ( $2.88 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) was determined based on the absorbance of this solution at a wavelength of 260 nm, at which the molar absorption coefficient is equal to  $6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [72]. The absorbance ratio at wavelengths 260 nm and 290 nm ( $A_{260}/A_{290}$ ) was above 1.8, which proves that the DNA solution was

sufficiently protein-free. AQ-NetOH solutions optimal for spectrophotometric measurements were prepared by dissolving an aliquot of the compound in Tris/HCl (pH 7.4) and brought to a concentration of  $2.52 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  by successive dilutions. Spectrophotometric titration was performed using an automatic dosing system in continuous mode, introducing portions of the DNA solution into the measuring cuvette at 3-minute intervals. It was previously established that no changes in absorbance over time were observed after adding one portion of an excess amount of DNA solution to the AQ-NetOH solution. To avoid the effect of diluting the solution in the cuvette (due to the addition of titrant), a concentration correction was introduced.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Netropsin (NET) as a model system binding in the groove of the helix

Our previous studies have experimentally validated the legitimacy of employing the switchSense technique for analyzing the interactions between small-molecule compounds and DNA helix [33]. To investigate DNA binding kinetics, we conducted studies using ethidium bromide (EB), a well-established model intercalator in molecular biology. EB served as a suitable model system for designing experiments to explore analyte-DNA binding kinetics, establish measurement parameters and ranges, and assess the impact of various factors (such as buffer type, solution ionic strength, analyte solution and buffer flow rates) on results. Given the limited usage of the switchSense technique in such research, literature lacks reports on how binding modes influence the association and dissociation process of the DNA-analyte adduct. The observed differences in processes and determined kinetic parameters could stem from a different bonding mode (groove binding instead of intercalation) or be unique to the studied group of sulfonamide compounds. Consequently, it is imperative to investigate the interaction of a broader range of model systems with confirmed binding modes using the switchSense technique. To study interaction with DNA helix groove netropsin (NET) was selected as the model system.

Netropsin (Fig. 1) is notable as one of the pioneering compounds demonstrating selective binding within the minor groove of the helix [73-79]. As a peptide antibiotic, it effectively combats both Gram-positive and Gram-negative bacteria by impeding nucleic acid synthesis. NET exhibits a marked affinity for binding to A/T base-rich regions of the helix, facilitated by hydrogen bonding and hydrophobic interactions. Additionally, its protonated amidine group interacts with the negatively charged sugar-phosphate backbone of the nucleic acid chain.

The results of the NET-DNA interaction analysis recorded with the switchSense technique at three temperatures (25, 30, 37 °C) are presented in Fig. 1B. The fluorescence graph exhibits a distinct pattern. Namely, there's a flat section lasting approximately 20 s at the beginning of measurement, during which the buffer flow is recorded and the analysis is prepared. Following this preparatory phase, around 20 s into the measurement, a sharp curve indicative of the NET-DNA association process is observed. This steep slope indicates rapid binding, occurring within mere seconds. Extending the analyte flow beyond this point (as assumed for this process to 30 s) does not yield significant changes in fluorescence intensity, as evidenced by another flat section between approximately 25 and 50 s into the measurement. This suggests the completion of the association process. Subsequently, the analyte solution flow through the chip is halted, and the buffer flow (without the analyte) is initiated, commencing the dissociation process. The dissociation slope also exhibits a sharp decline, indicating the rapid breakdown of the NET-DNA complex. Within just a few seconds, the fluorescence change approaches zero for all tested concentrations, confirming the complete dissociation of NET molecules from the DNA helix due to buffer washing. No notable differences in measurement trends were observed across the tested temperature range. Details regarding the determined kinetic parameters and binding constant can be found in Table 1.

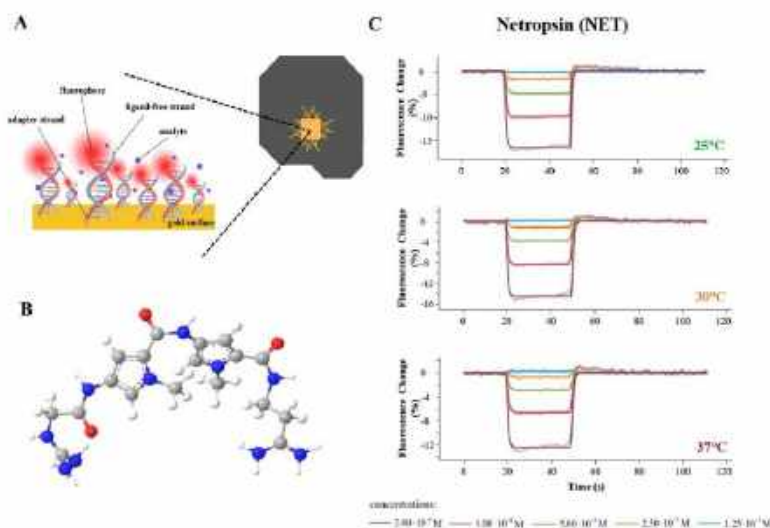


Fig. 1. A. Representation of the chip surface employed in the study. B. Configuration of the protonated NET molecule. N is indicated by blue spheres, C by gray, O by red, and H by white. C. Illustrative outcomes from the investigation of NET interaction with the DNA helix conducted at temperatures of 25 °C, 30 °C, and 37 °C, respectively. The thinner lines in each color denote the measurement points, while the bold line depicts the fitted data used for determining the kinetic parameters. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

The association rates ( $k_a$ ), dissociation rates ( $k_d$ ), association constants ( $K_A$ ), and dissociation constants ( $K_D$ ) along with their corresponding standard deviations determined for NET interactions with DNA using the static kinetic method of the switchSense technique.

Temp [°C]	$k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [M]	$K_A$ [ $M^{-1}$ ]
25	$(1.74 \pm 1.10) \cdot 10^9$	$1.29 \pm 0.30$	$(913 \pm 742) \cdot 10^{-6}$	$(1.66 \pm 1.35) \cdot 10^3$
30	$(1.49 \pm 1.14) \cdot 10^9$	$1.43 \pm 0.11$	$(950 \pm 735) \cdot 10^{-6}$	$(1.04 \pm 0.80) \cdot 10^3$
37	$(2.21 \pm 1.00) \cdot 10^9$	$1.23 \pm 0.07$	$(557 \pm 254) \cdot 10^{-6}$	$(1.80 \pm 0.82) \cdot 10^3$

The course of fluorescence changes and the character of the measurement curves of the association and dissociation processes of NET against DNA were very similar to those observed in previous studies for the model intercalating compound - ethidium bromide [33]. Unfortunately, no direct correlation between the course of association and dissociation processes registered with the switchSense technique and the binding mode was observed.

### 3.2. Pyrazine-2-thiocarboxamide (PTCA) interaction studies

In the presented studies, we focused on the sulfur analog of PZA, pyrazine-2-thiocarboxamide (PTCA), with its proven antifungal properties [59]. The research obtained in the publication [59] demonstrated the biological activity of the PTCA compound against *C. albicans*. The PTCA's interaction with CT-DNA has already been analyzed in our group previously using spectrophotometric and voltammetric methods [30]. The obtained results suggested the groove interaction mode but did not allow for unambiguous determination of the binding mode and binding sites with the DNA helix. However, they can be a good reference point for the results obtained using the switchSense technique.

The most important binding sites of the compounds in question

(including the PTCA) are presented in Fig. 2. The calculations of low-resolution molecular docking (1 Å grid point spacing) indicate that all of the most important binding sites are located in minor grooves. When it comes to the most popular binding site, i.e., a site characterized by the highest number of dockings, a third minor groove from the anchor was found to be predominant, regardless of the system considered. Mentioned groove is made of TA pairs. Concerning the strongest binding, however, other minor grooves are critical. In the case of PTCA, it is the first one from the anchor. The fact that the first minor groove is made of TGTC sequence shows that PTCA does not exhibit any propensity towards particular nucleobases.

The PTCA molecule is bonded by the highest amount of energy via the first minor groove with binding energy equal to 5.50 kcal/mol. The corresponding inhibition constant was calculated to be equal to 153.01 μM. It can be seen from Fig. 3B that in the strongest bonded conformation two hydrogen atoms of the sulfonamide group are weakly bonded to the N atom of quinine. The corresponding bond lengths are equal to 2.530 and 2.848 Å. The most popular binding mode for PTCA also happens to be the one bonded by the least amount of energy, i.e., 3.20 kcal/mol. In this conformation, there is only one evident non-covalent interaction, namely an H-bond between the H atom of the sulfonamide group and the N atom of adenine.

A completely different course of association and dissociation processes of the PTCA-DNA adduct (Fig. 3C) was observed than in the case of NET (Fig. 1C) or EB [33]. The process of PTCA binding to the helix was slow, as evidenced by the shape of the association curve. Moreover, the buffer flow did not completely dissociate the formed PTCA-DNA adduct despite running the process for four minutes. This indicates that while the bonding process might be slow, it remains relatively stable under buffer flow conditions. To accurately determine the parameters of interaction kinetics (as shown in Table 2), data fitting was conducted utilizing a calculation model that accounts for the partial dissociation of the analyte, aiming for the highest possible accuracy.

The process of PTCA association with the DNA helix was about 20 000 times slower than for EB [33], and about 30 times slower than for

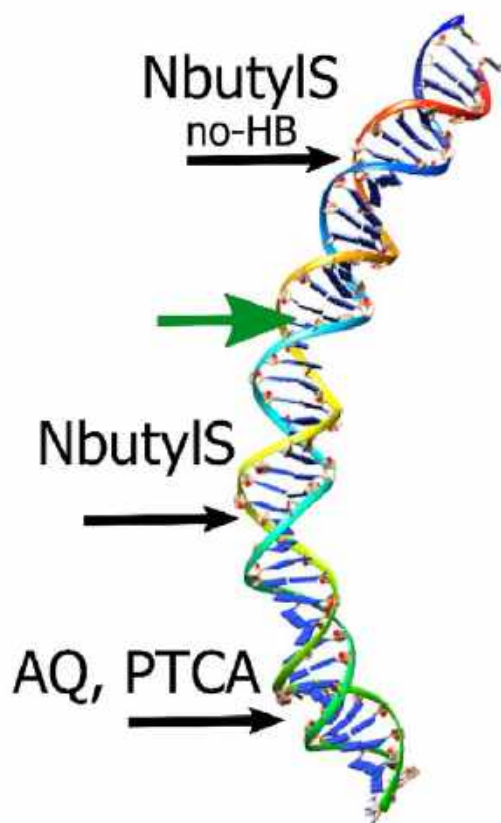


Fig. 2. The positions of the sites characterized by the highest value of the ligand-receptor binding energy (black arrow) as well as the most popular site for every ligand considered (green arrow) calculated with 1 Å grid point spacing. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

NET. While the temperature had no significant effect in this system studied on the  $k_a$  values, its effect on the dissociation rate ( $k_d$ ) resulted in a clear trend in the determined values of the association constant ( $K_A$ ). A decrease in the  $K_A$  value was observed with increasing temperature. The value of the association constant ( $K_A$ ) determined using the switchSense technique ( $4.36 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  at 25 °C) is lower than the values obtained by the voltammetric methods ( $1.16 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  and  $1.04 \cdot 10^4$  with CV and DPV respectively) and the spectrophotometric method ( $5.14 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) [80]. However, it should be remembered that not only do the conditions for conducting these experiments differ from each other (e.g. type of DNA used), but also each of these techniques uses different physicochemical properties of studied compounds. Additionally, switchSense analyzes the binding process occurring in the buffer flow in real-time, while the spectrophotometric and voltammetric approaches use the analysis of equilibria occurring in the solution to determine the binding constant.

### 3.3. 4-amino-N-(2-aminobutyl)benzenesulfonamide (NbutylS) interaction studies

The sulfonamide derivative selected for this research, 4-amino-N-(2-

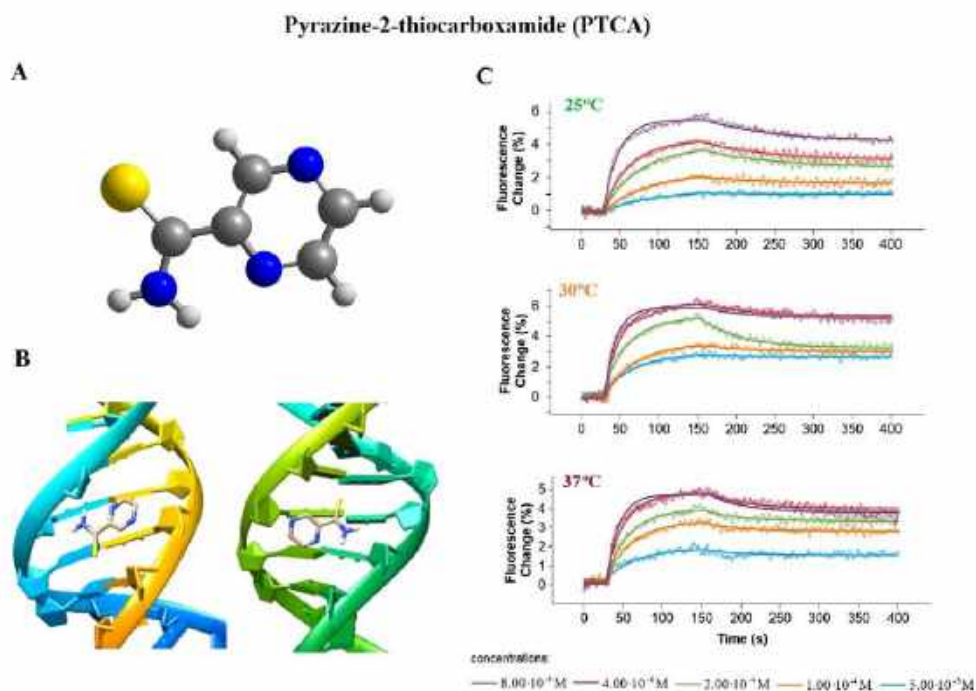
aminobutyl)benzenesulfonamide (NbutylS) is a homolog of compounds previously studied by our group. In the case of molecules with a shorter alkylamino chain, their synthesis, physicochemical and complex-forming properties, and interaction with DNA were already investigated. The results reported in the mentioned papers revealed both solid and stable binding to nucleic acid and the ability to form complexes with Rh(III) and Ru(III) ions [33,81]. Due to the spectroscopic and electrochemical properties of the studied group of homologs (including NbutylS), determining the binding constant with DNA using spectrophotometric and voltammetric techniques turned out to be very problematic [33]. The overlap of the absorption bands of the analyte and nucleic acid and the low intensity of the current signal made it necessary to use other methods - theoretical calculations and the switchSense technique.

Because of the possibility of forming an intramolecular hydrogen bond involving the NbutylS alkylamino chain [60], both the structure of the molecule with an unbonded chain (no-HB) and with an intramolecular hydrogen bond (HB) were taken into account in the calculations (Fig. 4A). For NbutylS (no-HB), in the strongest bonded conformation (Fig. 4B top, right) there are four H-bonds formed between the analyte and the receptor. First between the aromatic amine group of sulfonamide and O atom of the carbonyl group of thymine (2.029 Å). Second between the H-atom of the sulfonamide group and the O atom of the carbonyl group of cytosine (2.936 Å). Last to arise from the H atoms of the alkylamine group and are directed towards the O atom of phosphate (2.012 Å) deoxyribose and carbonyl group of thymine. The energy calculated for this conformation was calculated to be equal to  $-7.53 \text{ kcal/mol}$  whereas the inhibition constant was determined to be equal to  $3.04 \mu\text{M}$ .

In the case of NbutylS (HB) (Fig. 4B top, left) there are three hydrogen bonds between the ligand and receptor. The first one bonds the alkylamine group with the third N atom of the purine moiety of adenine (2.230 Å). The other H atom of alkylamine groups is bonded to the sulfonamide group of the ligand keeping its conformation closed. The other hydrogen bond is formed between the sulfonamide group and the O atom of deoxyribose (1.951 Å). The last of the intermolecular H-bonds observed here is formed between the aromatic amine group of analyte and the O atom of deoxyribose (2.315 Å). All in all, the energy for this binding mode was calculated to be equal to  $-6.99 \text{ kcal/mol}$ , whereas the inhibition constant is equal to  $7.55 \mu\text{M}$ . It can be seen that the highest binding energies for the compounds in question are somewhat similar, as that of AQ is only 0.59 kcal/mol higher than that of Nbutyl (HB). The difference is significantly different when one compares the inhibition constant, as that of AQ is circa 2.7 times smaller than that of Nbutyl (HB).

As for the most popular binding site (Fig. 4B bottom), located in the third minor groove from the anchor, in the case of NbutylS (no-HB), there are two bonds. Namely, one connecting aromatic amine group with (2.068 Å) with the carbonyl group of thymine and one binding alkylamine group with deoxyribose (2.136 Å). For NbutylS (HB) there is a single H-bond between the ligand and receptor, connecting the aromatic amine of the ligand with the carbonyl group of thymine.

On the fluorescence change plots, registered with the switchSense technique (Fig. 4C) a very similar course of association and dissociation processes of the NbutylS-DNA adduct was observed as for PTCA and sulfonamide homologs: NethylS and NpropylS. Namely, the association process took place very slowly and the analyte flow lasted the longest of all the compounds studied in this work - as much as 240 s (4 min). The curves representing the bonding taking place have a very modest slope. The graph shows the slow and incomplete dissociation process of the formed adduct after the end of the analyte flow. This means that the interaction between the analyte and DNA occurs slowly, but the resulting adduct is so stable that even extending the dissociation stage to 480 s (8 min) does not lead to its complete dissociation. Moreover, the nature of changes in the initial part of the adduct dissociation process (approx. the first minute) was different from the further course of dissociation. Namely, in the first minute of adduct disintegration forced



**Fig. 3.** A. The optimized *ab initio* structure of PTCA, indicated atoms with spheres: S atom (yellow), N atom (blue), C atom (grey), and H atom (white). B. Two conformations of aPTCA-DNA complex resulting from docking simulations targeting key grooves using calculations with a 0.303 Å grid point spacing. The left image depicts the most strongly bonded conformation, while the right image shows the most prevalent conformation. C. Illustrative outcomes from the investigation of PTCA interaction with the DNA helix conducted at temperatures of 25 °C, 30 °C, and 37 °C, respectively. The thinner lines in each color represent individual measurement points, while the bold line illustrates the fitted data used for determining kinetic parameters. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

**Table 2**

The association rates ( $k_a$ ), dissociation rates ( $k_d$ ), association constants ( $K_A$ ), and dissociation constants ( $K_D$ ) along with their corresponding standard deviations determined for PTCA interactions with DNA using the static kinetic method of the switchSense technique.

Temp [°C]	$k_a$ [ $M^{-1} \cdot s^{-1}$ ]	$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [M]	$K_A$ [ $M^{-1}$ ]
25	$53.4 \pm 3.4$	$(1.23 \pm 0.06) \cdot 10^{-2}$	$(2.30 \pm 0.18) \cdot 10^{-4}$	$(4.36 \pm 0.33) \cdot 10^4$
30	$61.5 \pm 3.0$	$(1.95 \pm 0.09) \cdot 10^{-2}$	$(3.17 \pm 0.21) \cdot 10^{-4}$	$(3.16 \pm 0.21) \cdot 10^4$
37	$59.0 \pm 3.0$	$(2.92 \pm 0.13) \cdot 10^{-2}$	$(4.37 \pm 0.41) \cdot 10^{-4}$	$(2.29 \pm 0.31) \cdot 10^4$

by buffer flow, greater changes in the fluorescence of the signaler were observed (the dissociation process occurred more intensively) compared to the next 7 min, when the fluorescence intensity changed much slower (the dissociation process occurred to a minor extent). Due to such type of changes observed during the measurement of binding kinetics, an incomplete dissociation model was used to calculate the kinetic parameters (Table 3).

The determined parameters of the rate formation and dissociation of adduct ( $k_a$  and  $k_d$ ) were used to calculate the values of association (binding) constants ( $K_A$ ). The values of approximately  $1 \cdot 10^4 M^{-1}$ , presented in Table 3 are higher than those obtained for the NethylS and NpropylS homologs previously tested by our group [33]. Moreover, an

explicit increase in both the association rate value ( $k_a$ ) and the binding constant value ( $K_A$ ) was observed with increasing temperature.

#### 3.4. AQ-NetOH as a representative of anthraquinones with intercalating properties

The outcomes of the high-resolution molecular docking (using a 0.303 Å grid point spacing) targeted at the crucial grooves are illustrated in Fig. 5B. The predominant binding site for AQ-NetOH lies in the third minor groove from the anchor, consistent with the other systems. However, AQ exhibits the strongest bond energy when attached to the first minor groove, akin to PTCA. The fact that the first minor groove is made of the TGTC sequence shows that also AQ-NetOH does not show any bias towards specific nucleobases. The most prevalent conformation corresponding to the binding is presented on the right side of Fig. 5B. It can be seen that the intramolecular hydrogen bond is formed between the H atom of the hydroxyl group of AQ-NetOH and the O atom of the deoxyribose. The length of the discussed bond is equal to 1.974 Å. The other notable intramolecular interaction is the 1.924 Å long H-bond formed between the H atom from the amino group of AQ and the O atom of the carbonyl group of thymine. Overall, the energy calculated for this interaction is equal to -7.58 kcal/mol, whereas the inhibition constant is equal to 2.79 μM, which are respectively the highest and the lowest values calculated for all systems in this study. Inevitably the -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH group attached to the anthraquinone is crucial for its binding to the DNA helix.

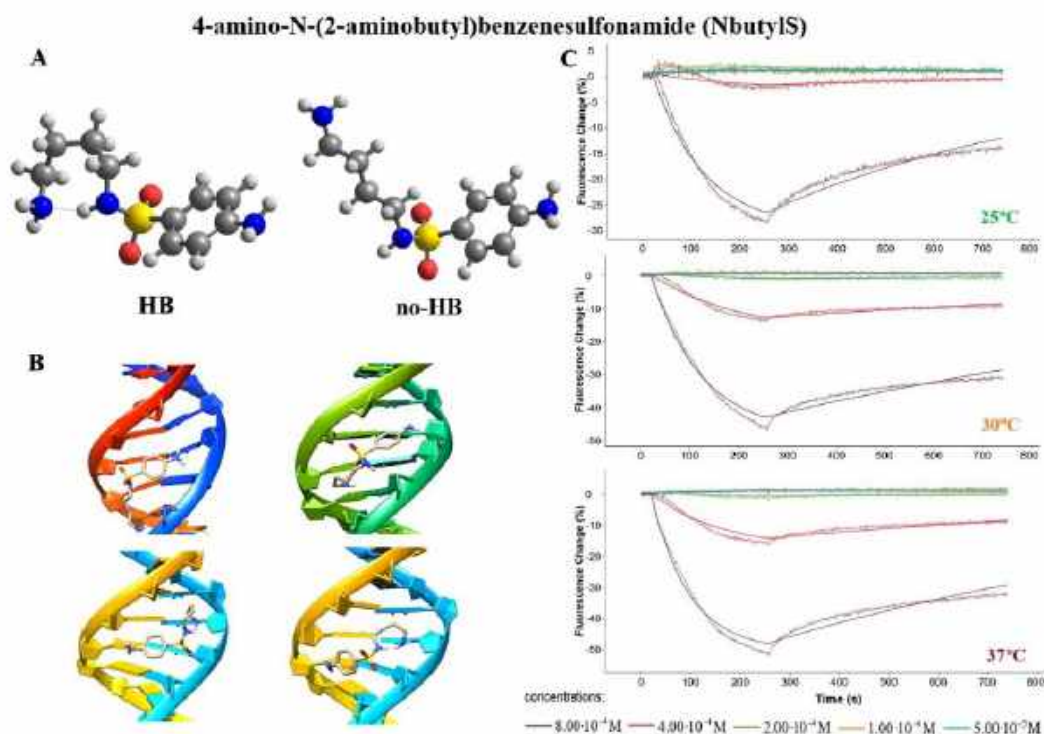


Fig. 4. A. The equilibrium structure of *ab initio* optimized NbutylS, depicted with an intramolecular hydrogen bond (HB), as well as with an unbonded chain (no-HB). B. Two conformations of a NbutylS-DNA complex resulting from docking simulations targeting key grooves using calculations with a 0.303 Å grid point spacing. The top image illustrates the most strongly bonded conformation, while the bottom image displays the most prevalent conformation. C. Representative outcomes of analyses regarding NbutylS interaction with the DNA helix conducted at temperatures of 25 °C, 30 °C, and 37 °C, respectively. The thinner lines in each color denote individual measurement points, while the bold line illustrates the fitted data used for determining kinetic parameters.

Table 3

The association rates ( $k_a$ ), dissociation rates ( $k_d$ ), association constants ( $K_A$ ), and dissociation constants ( $K_D$ ) along with their corresponding standard deviations determined for NbutylS interactions with DNA using the static kinetic method of the switchSense technique.

Temp (°C)	$k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [M]	$K_A$ [ $M^{-1}$ ]
25	$10.6 \pm 0.3$	$(1.35 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	$(1.27 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$	$(7.87 \pm 0.23) \cdot 10^2$
30	$11.4 \pm 0.2$	$(8.19 \pm 0.07) \cdot 10^{-4}$	$(7.16 \pm 0.13) \cdot 10^{-4}$	$(1.40 \pm 0.03) \cdot 10^4$
37	$15.5 \pm 0.2$	$(1.02 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$	$(6.60 \pm 0.12) \cdot 10^{-4}$	$(1.51 \pm 0.03) \cdot 10^4$

SwitchSense kinetics studies of the AQ-NetOH interaction with DNA showed a completely different course of registered changes compared to the pyrazine and sulfonamide derivatives. Namely, the association occurs very quickly and is manifested by about a 10 % sharp fluorescence change curve in the first seconds of the analyte flow. Then we observe a rectilinear section showing the complete binding of the analyte to the DNA helix. After only 30 s of binding, the analyte flow is stopped and the subsequent dissociation process is very fast and complete. This is evidenced by a sharp curve of fluorescence changes and the return of the signal to the initial value. In general, the course of the measurement is

very similar to that obtained for ethidium bromide. The determined kinetic parameters, listed in Table 4, confirm the very rapid formation of the AQ-NetOH adduct with DNA. The  $k_a$  value is about 30 times lower than for EB, but as much as 1000 times higher than in the case of PTGA and even several thousand times higher than for NbutylS. The formed adduct also disintegrates very quickly under the influence of the buffer flow. Namely, its dissociation occurs within about 1 s, as evidenced by the  $k_d$  values. The value of the  $K_A$  constant, calculated based on the rates of association and dissociation, is equal to  $4.97 \cdot 10^4 M^{-1}$  at 25 °C, which is the highest value among all determined with the switchSense technique for the compounds presented in this work. At the same time, it is two orders of value lower than in the case of EB, which at this temperature was characterized by the  $K_A$  value of approx.  $4 \cdot 10^6 M^{-1}$ . The values of the association constant slightly decrease as the temperature at which the experiment was conducted increases.

In the case of the anthraquinone derivative, spectrophotometric studies were also performed. The spectroscopic properties of the analyte enabled the study of AQ-NetOH interaction with DNA using this method, which had not been published before. The AQ-NetOH compound in the Tris/HCl buffer in the wavelength range of 350–200 nm has three absorption maximums of 316 nm, 276 nm, and 247 nm with corresponding molar absorption coefficient values of 6025, 9990, and  $35,190 dm^2 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ , respectively (Fig. 6A). In the visible range, there is also a maximum at 512 nm, which results in a pale red color of the solution.

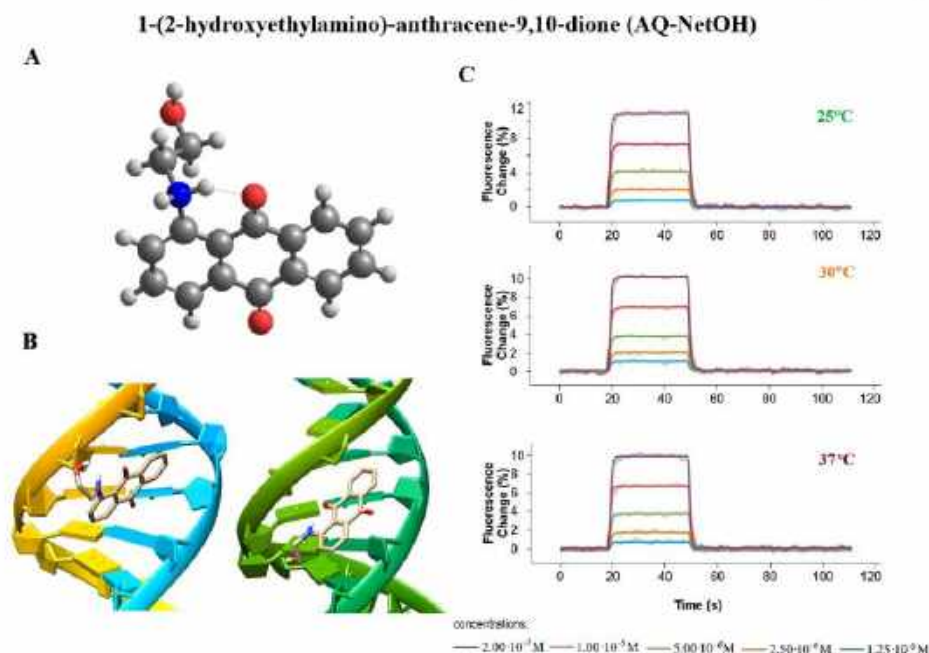


Fig. 5. A. The equilibrium structure of ab initio optimized AQ-NetOH. B. Two conformations of an AQ-NetOH-DNA complex resulting from docking simulations targeting key grooves using calculations with a 0.303 Å grid point spacing. The left image illustrates the most strongly bonded conformation, while the right image displays the most prevalent conformation. C. Representative outcomes of analyses regarding AQ-NetOH interaction with the DNA helix conducted at temperatures of 25 °C, 30 °C, and 37 °C, respectively. The thinner lines in each color represent individual measurement points, while the bold line illustrates the fitted data used for determining kinetic parameters.

Table 4

The association rates ( $k_a$ ), dissociation rates ( $k_d$ ), association constants ( $K_A$ ), and dissociation constants ( $K_D$ ) along with their corresponding standard deviations determined for AQ-NetOH interactions with DNA using the static kinetic method of the switchSense technique.

Temp [°C]	$k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [M]	$K_A$ [ $M^{-1}$ ]
25	$(4.78 \pm 0.61) \cdot 10^4$	$0.96 \pm 0.02$	$(2.01 \pm 0.24) \cdot 10^{-5}$	$(4.97 \pm 0.65) \cdot 10^4$
30	$(5.85 \pm 2.06) \cdot 10^4$	$1.27 \pm 0.05$	$(2.17 \pm 0.77) \cdot 10^{-5}$	$(4.60 \pm 1.63) \cdot 10^4$
37	$(3.71 \pm 1.27) \cdot 10^4$	$0.91 \pm 0.17$	$(2.43 \pm 0.95) \cdot 10^{-5}$	$(4.12 \pm 1.02) \cdot 10^4$

To ascertain the binding constant of AQ-NetOH to DNA, a spectrophotometric titration was conducted. This involved monitoring changes in analyte absorbance with increasing DNA concentration. The titration was recorded within the 350–200 nm range (Fig. 6), following confirmation that spectral changes in the visible range were of minimal intensity (Figure S1). Notably, a notable rise in absorbance values (with no alteration in their positions) was observed for the 276 nm and 247 nm bands. Unfortunately, this is also the extent of DNA absorption. To confirm that changes in absorbance are the result of interactions of the compound with DNA, nucleic acid absorbance was subtracted from the measurement spectra (Figure S2) [82]. It can be seen in Figure S2 that both maxima (at 276 and 247 nm) occur in their descending intensity compared to the observations for the original solution. Additionally, the band at 276 nm was bathochromically shifted to 286 nm.

To avoid the effect of overlapping of the absorption bands of AQ-NetOH and DNA, the binding constant was determined for changes in absorbance at a wavelength of 316 nm, at this energy the DNA solution does not absorb (Fig. 6A). For justification, a plot was made showing the spectral changes at this wavelength as a function of the DNA/AQ-NetOH molar ratio (Fig. 6B). A slight increase in absorbance is observed with DNA concentration growth, which stops after exceeding the 1:1 DNA:AQ-NetOH molar ratio. This means that subsequent DNA portions do not introduce any spectral changes. Based on the presented observations, it can be concluded that there is an interaction of DNA with AQ-NetOH. However, it cannot be clearly stated whether it has an intercalation character because the hypochromic effect and bathochromic shift are only observed in the spectra after subtracting DNA absorption (Figure S2).

The value of the binding (association) constant was determined using the Benesi-Hildebrand equation [83]:

$$\frac{A_0}{(A - A_0)} = \frac{1}{(A_\infty - A_0)} + \frac{1}{(A_\infty - A_0)K} \cdot \frac{1}{[DNA]} \quad (3)$$

where  $A_0$ ,  $A$ , and  $A_\infty$  denote the absorption in the absence, at intermediate and infinite DNA concentrations, respectively. This relationship can be presented in the form of a linear equation  $y = ax + b$  in which the variables are  $A_0/(A - A_0)$  and  $1/[DNA]$ . The binding constant, determined from the ratio of the intercept to the slope of the graph (Fig. 6C), is found to be  $9.97 \cdot 10^4 M^{-1}$  using spectrophotometric titration.



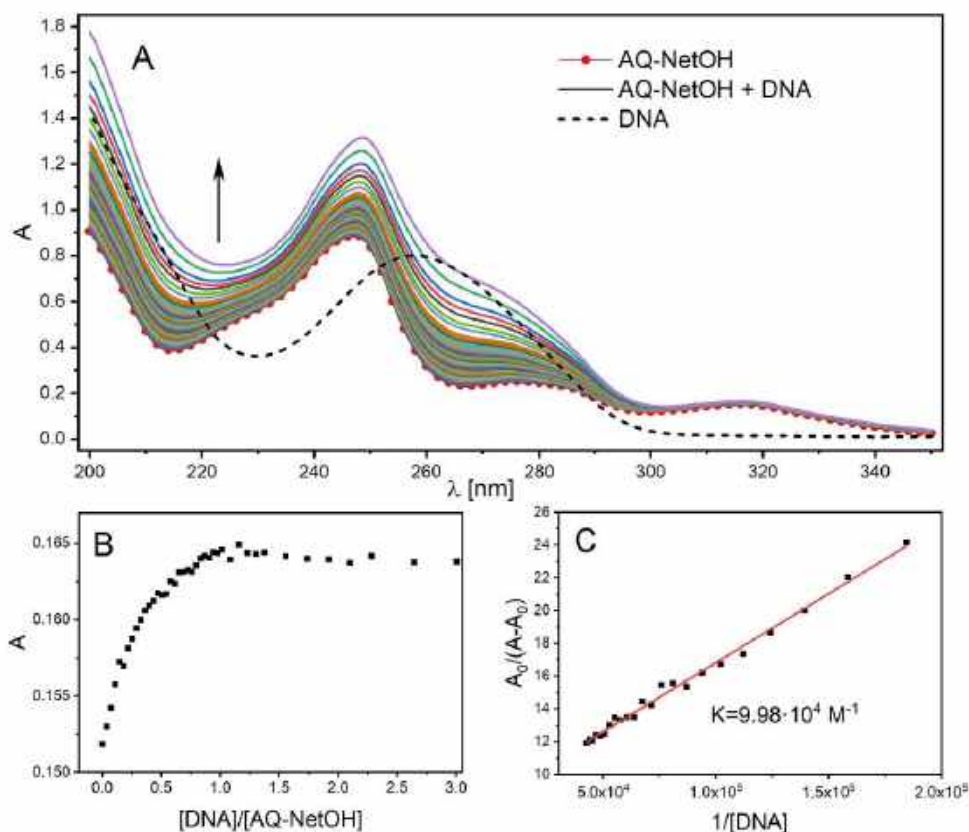


Fig. 6. UV-VIS spectra of the AQ-NetOH-DNA adduct. A. UV-VIS absorption spectra of AQ-NetOH ( $2.52 \cdot 10^{-5}$  M) with increasing concentrations of DNA ( $0-6 \cdot 10^{-9}$  M) in Tris/HCl buffer (pH 7.4). The arrow indicates the direction of change during titration. The dashed black line represents the spectrum of the DNA solution. B. Changes in absorbance at 316 nm concerning the molar ratio [DNA]/[AQ-NetOH]. C. Benesi-Hildebrand plot of AQ-NetOH and DNA (absorption at 316 nm), assuming a 1:1 association between the two.

#### 4. Conclusions

This study utilizes three methodological approaches to describe analyte interactions with DNA, providing insights into binding strength, mode, and kinetics. Despite switchSense's convenience in determining kinetic parameters, it lacks information about binding sites and modes. Comparative studies with other techniques confirm this limitation, especially evident with netropsin (NET).

Computational studies and UV-Vis spectrophotometry complement switchSense findings, revealing differences in analyte interactions with DNA. Notably, anthraquinone derivative (AQ-NetOH) exhibits the highest association rate, indicating rapid adduct formation. Temperature variations influence binding kinetics differently among analytes. While PTCA shows accelerated dissociation at higher temperatures, NbutylS demonstrates enhanced association, emphasizing the complex nature of these interactions.

Finally, switchSense technique presents a promising tool for rapid compound bioactivity assessment in chemical laboratories. Though binding constant values may slightly differ from other techniques, switchSense's real-time analysis offers unique insights into association and dissociation kinetics. Expanding research to metal ion complexes

and other molecular targets like proteins is a future direction for our group.

#### CRediT authorship contribution statement

Aleksandra Giesielska: Writing – original draft, Investigation. Jakub Brzeski: Writing – review & editing, Writing – original draft, Investigation. Dorota Zarzecka: Writing – original draft, Investigation. Magdalena Stasiuk: Investigation. Mariusz Makowski: Writing – review & editing, Writing – original draft. Sandra Brzeska: Writing – review & editing, Writing – original draft, Project administration, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

A. Cieślak et al.

**Data availability**

Data will be made available on request.

**Acknowledgments**

The research received funding from the Polish National Science Centre (NCN) under Grant No. 2022/06/X/ST4/00177 (recipient Dr. Sandra Bzroska). Computational calculations were performed using resources provided by the Wrocław Centre for Networking and Supercomputing (<http://wcss.pl>) under grant No. 560. The authors express their gratitude to Dr. Paweł Niedziałkowski for his invaluable assistance with synthesis.

**Appendix A. Supplementary material**

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.124313>.

**References**

[1] Y. Yi, S. Yang, Y. Liu, B. Yin, Z. Zhao, G. Li, Z. Huang, L. Chao, F. Liu, R. Shang, S. Liu, Antibiotic resistance and drug modification: Synthesis, characterization and bioactivity of newly modified potent pneumococcal derivatives with a substituted piperazine moiety, *Bioorg. Chem.* 152 (2023) 106353, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106353>.

[2] C. Wang, H. Lu, K. Li, Y. Zhu, Y. Ji, W. Lu, G. Wang, W. Dong, M. Liu, X. Wang, H. Chen, C. Tu, Identification of an anti-virulence drug that reverses antibiotic resistance in multidrug resistant bacteria, *Bioess. Pharmacother.* 153 (2022) 113334, <https://doi.org/10.1016/j.bioess.2022.113334>.

[3] M.N. Gupta, A. Alam, S.E. Hassan, Protein permeability in drug discovery, drug-repositioning and antibiotic resistance, *Biochimie* 175 (2020) 50–57, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.08.004>.

[4] A. Alroughayyan, A.-Z. Al-Hazza, A.A. Hussa, F. Al-Sagheer, Antibiotic resistance and drug modification: Synthesis, characterization and bioactivity of newly modified potent ciprofloxacin derivatives, *Bioorg. Chem.* 108 (2021) 104658, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104658>.

[5] T.N. Almannan, S.A. Alyahya, J.M. Khalid, M.R. Shehu, N.S. Alharbi, S. Kordubusman, A.S. Alshaidi, A. Khalid Almkhrani, The extensive drug resistance (XDR) *Staphylococcus aureus* strains among patients: A retrospective study, *Saudi J. Biol. Sci.* 27 (2020) 1985–1992, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.005>.

[6] J.M.O. de la Rosa, M.A. Fernández, Á. Rodríguez-Villodres, C.-S.-G. de Sotomayor, J. M. Chamorro, J.A. Lape, High-level delamanid resistance through the combination of two different mechanisms in *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Antimicrob. Agents* (2023) 106795, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106795>.

[7] Z. Shi, Y. Li, A. Hu, J. Cui, M. Shao, L. Zhu, S. Yang, Y. Liu, G. Deng, C. Zhu, Duplex real-time fluorescent recombinase polymerase amplification for the rapid and sensitive detection of two resistance genes in drug-resistant *Staphylococcus aureus*, *J. Microbiol. Methods* 202 (2022) 106590, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106590>.

[8] C. Zhang, Q. Ouyang, X. Zhou, Y. Huang, Y. Jeng, L. Deng, D. Lin, W. Zheng, In vitro activity of tetracycline analogs against multidrug-resistant and extensive drug resistance clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, *Tuberculosis* 140 (2023) 102336, <https://doi.org/10.1016/j.tube.2023.102336>.

[9] G. Xu, H. Liu, X. Jia, X. Wang, P. Xu, Mechanisms and detection methods of *Mycobacterium tuberculosis* rifampicin resistance: The phenoxazone of drug resistance is complex, *Tuberculosis* 128 (2021) 102963, <https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102963>.

[10] J. Domínguez, M.J. Boeree, E. Cambau, D. Chesov, F. Conrardie, V. Cox, E. Dheda, A. Dudnyk, M.R. Farhat, S. Gagneux, M.F. Grossbach, M.I. Grischel, L. Guglielmetti, I. Kostevaya, B. Lange, F. van Leth, C. Lienhardt, A.M. Mandalakas, F.P. Maurer, M. Merker, P. Miotto, B. Molina-Moya, F. Morel, S. Niemann, N. Veziris, A. Whiteslaw, C.R. Horsburgh, C. Lange, J. Dominguez, M.J. Boeree, E. Cambau, D. Chesov, F. Conrardie, V. Cox, K. Dheda, A. Dudnyk, M.R. Farhat, S. Gagneux, M. F. Grossbach, M.I. Grischel, L. Guglielmetti, I. Kostevaya, B. Lange, F. van Leth, C. Lienhardt, A.M. Mandalakas, F. Maurer, M. Merker, P. Miotto, B. Molina-Moya, F. Morel, S. Niemann, N. Veziris, A. Whiteslaw, C.R. Horsburgh, C. Lange, Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a 2023 TBnet/RESIST-TB consensus statement, *Lancet Infect. Dis.* 23 (2023) e122–e137, <https://doi.org/10.1016/j.laninf.2023.09.009>.

[11] X. Su, J. Wu, F. Xu, S. Pattaradilokrajte, Genetic mapping of determinants in drug resistance, virulence, disease susceptibility, and interaction of host-coolant malaria parasites, *Parasitol. Int.* 91 (2023) 102637, <https://doi.org/10.1016/j.parint.2023.102637>.

[12] I. Chen, M.S. Haung, Triple artemisinin-based combination therapies for malaria: a timely solution to counter antimalarial drug resistance, *Lancet Infect. Dis.* 22 (2022) 751–753, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00744-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00744-9).

[13] L. Blazuel, A. Zhabkova, C.J. Villabona-Arenas, K.E. Atkins, S. Hoo, O. Caswell, Drug resistance mutations in HIV: new bioinformatics approaches and challenges, *Curr. Opin. Virol.* 51 (2021) 56–64, <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.08.009>.

*Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 316 (2024) 124313

[14] J. Xuan, W. Feig, J. Wang, R. Wang, B. Zhang, L. Bo, Z.-S. Chen, H. Yang, L. Sun, Aziridinol peptide for combating drug-resistant bacterial infections, *Drug Resist. Updat.* 65 (2023) 100954, <https://doi.org/10.1016/j.drup.2023.100954>.

[15] A. Gupta, P. Sharma, T.P. Singh, S. Sharma, Phosphotriesterase Adenylyltransferase: A promising drug target to combat antibiotic resistance, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, in: *Proteins and Proteomics* 1869, 2021, p. 140566, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140566>.

[16] G. Niu, W. Li, Next-generation drug discovery to combat antimicrobial resistance, *Trends Biochem. Sci.* 44 (2019) 961–972, <https://doi.org/10.1016/j.tics.2019.05.003>.

[17] P. Spitz, A. Chylewska, A. Królka, S. Ramotowska, A. Dąbrowska, M. Makowski, Stimulation of sulfonamides antibacterial drug activity as a result of complexation with Ru(II): physicochemical and biological study, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 15482, <https://doi.org/10.3390/ijms222415482>.

[18] O.K. Graves, W. Kim, M. Ozcan, S. Ashraf, H. Turker, M. Yum, C. Zhang, A. Madanoglu, X. Li, Discovery of drug targets and therapeutic agents based on drug repositioning to treat lung adenocarcinoma, *Biomed. Pharmacother.* 161 (2023) 114486, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114486>.

[19] X. J. Dai, L. P. Xue, S. K. Ji, Y. Zhou, Y. Guo, Y. C. Zheng, H. M. Liu, H. M. Liu, Triazole-fused pyrazolines in target-based anticancer drug discovery, *Eur. J. Med. Chem.* 249 (2023) 115101, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115101>.

[20] M. Hunkelid, A.N. Volkov, J. Wouters, Targeting the phosphoinositide phosphatase MtsB2 for tuberculosis drug discovery, an hybrid knowledge based fragment based approach, *Eur. J. Med. Chem.* 245 (2023) 114925, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.114925>.

[21] J. Wu, Y. Xiao, M. Lin, H. Cai, D. Zhao, V. Li, H. Luo, C. Tang, L. Wang, DeepCancerMap: A versatile deep learning platform for target- and cell-based anticancer drug discovery, *Eur. J. Med. Chem.* 225 (2023) 115401, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115401>.

[22] F. Arabi, V. Mansouri, N. Abnashbeigi, Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview, *Bioess. Pharmacother.* 153 (2022) 113324, <https://doi.org/10.1016/j.bioess.2022.113324>.

[23] O. Barbey, H. Lulka, N. Hanouh, H. Bellah@Tahar, F. Vernejoul, G. Cambos, M. Tirubiy, L. Buscail, F. Gouss, P. Gardier, Preclinical development of non-viral gene therapy for patients with advanced pancreatic cancer, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 29 (2023) 162–172, <https://doi.org/10.1016/j.mtm.2023.03.005>.

[24] M. Benler, A.R. Homann, M. Mihalic, S. Plennik, L. Niekling, M. Eckart, V. Allerhellgen, D. Czernatis, B. Mohajeri, B. Shrestha, N. Parpleva, L. Tuzov, Z. Seyfudinov, S. Hofmann-Thiel, W. Grunze, C. Metzger-Bodden, N. Passt, H. Hoffmann, Rapid tuberculosis diagnostics involving molecular first- and second-line resistance testing based on a novel microfluidic DNA extraction cartridge, *J. Mol. Diagn.* 23 (2021) 643–650, <https://doi.org/10.1016/j.jmoldiag.2021.02.004>.

[25] C. Craciun, A.-L. Keul, M. Flantz, M. Clatona, DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hlyA*, *ngfA*, *spvC* and *sef* genes, *J. Environ. Manage.* 95 (2012) 515–518, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.07.027>.

[26] B. Kalyani Bhardwaj, P.S. Suresh, Synthesis, characterization and multi-spectroscopic DNA/HSA interaction studies of synthetic human Follicle-Stimulating Hormone Beta 33–53 peptide conjugated PEGylated graphene oxide nanoparticles, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 306 (2024) 123552, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.123552>.

[27] E. Tavakoli Hafajafari, N. Sobrabi, M. Eslami Moghadam, M. Ostad, Spectroscopy and molecular dynamic study of the interaction of calf thymus DNA by anticancer Pt complex with butyl glycine ligand, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 290 (2023) 122826, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.122826>.

[28] M. Amir, M. Azmi Qureshi, A. Iqbal, S.M. Nazeem, W. Ayoub Malik, S. Javed, Exploring the interaction of topotib with calf thymus DNA using molecular dynamics simulation and multispectroscopy techniques, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 308 (2024) 123678, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.123678>.

[29] S. Poulkarpagan, K.N. Venkai, K.P. Elango, Molecular spectroscopic and molecular simulation studies on the interaction of oral contraceptive drug Ormeloxifene with CT-DNA, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 278 (2022) 121351, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121351>.

[30] Z. Malak-Esfandiari, A. Rezaei-Noghabi, T. Sohrabi, P. Molubari, Z. Andri-Tehranchi, J. Chamani, Molecular dynamics and multi-spectroscopic of the interaction behavior between bladder cancer cells and calf thymus DNA with doxorubicin: apoptosis through the down regulation of PI3K/AKT signaling pathway, *J. Fluoresc.* 33 (2023) 1537–1557, <https://doi.org/10.1007/s10895-023-03189-4>.

[31] A.A. Moosavi-Movahedi, A.R. Golchin, K. Nazari, J. Chamani, A.A. Saboury, S. Z. Bzhoie, S. Tangestani-Nejad, Microenvironment, energetics and binding studies of DNA-diamethyln dichloride complexes, *Thermochim. Acta* 414 (2004) 233–241, <https://doi.org/10.1016/j.tca.2004.01.007>.

[32] F. Dehghani Sani, N. Shakibapoor, S. Beigoli, H. Sedeghina, M. Hossainzadeh, J. Chamani, Changes in binding affinity between doxorubicin and calf thymus DNA in the presence of histone H1: Spectroscopic and molecular modeling investigations, *J. Lumin.* 203 (2018) 599–606, <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.08.055>.

[33] S. Ramotowska, P. Spitz, J. Bzroska, A. Cieślak, M. Makowski, Application of the microscale technique for the study of small molecules (ethidium bromide and selected sulfonamide derivatives) affinity to DNA in real time, *J. Phys. Chem. B* 126 (2022) 7238–7251, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.2c02190>.

[34] H. Mylles-Landau, P.F. Varela, Standard operation procedure for swinchesense DRX systems, *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* 50 (2021) 389–400, <https://doi.org/10.1007/s00249-021-01519-5>.

- [35] A. Cléry, T.J.M. Sobin, T. Wells, A. Lange, F.H.T. Allan, *switchSENSE: A new technology to study protein-RNA interactions*, *Methods* 118–119 (2017) 137–143, <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2017.03.004>.
- [36] G. Bee, E. Emilian, *switchSENSE Technology for Analysis of DNA Polymerase Kinetics*, in: A. Poteraman (Ed.), *MULTIPROTEIN COMPLEXES: Methods and Protocols*, Humana Press Inc, Totowa, 2021, pp. 145–153, <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000635659700009> (accessed May 5, 2023).
- [37] M. Vieira, C. Pinheiro, R. Fernandes, J.P. Noronha, C. Prudêncio, *Antimicrobial activity of quinazoline 1,4-diazole with 2- and 3-substituted derivatives*, *Microbiol. Res.* 169 (2014) 287–293, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.015>.
- [38] G.S. Prudêncio, T.V. Kuznetsov, O.N. Oleshko, V.I. Shvedov, G.N. Petelin, T. N. Zykova, N.B. Lagunova, V. Pyridazinoquinazolinones, *Synthesis and study of the tuberculostatic activity of alkyl derivatives of dihydroquinazolin[3,4-b]quinazolinones*, *Pharm. Chem. J.* 11 (1977) 1349–1353, <https://doi.org/10.1007/BF01132242>.
- [39] H. Xu, L. Fan, *Synthesis and antifungal activities of novel 5,6-dihydro-lactolo[1,2-c]quinazolinone derivatives*, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 1919–1925, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.02.033>.
- [40] I. Singh, V. Lakshmi, K. Paul, *Effective synthesis of benzimidazole-imidazo[1,2-a]pyridine conjugates: A comparative study of imino- and bis-benzimidazoles for antibiotic activity*, *Eur. J. Med. Chem.* 180 (2019) 546–561, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.07.043>.
- [41] Y. Zhang, D. Mirshams, *The cyclic characteristics of pyrimidinamide: a review*, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 7 (2003) 6–21.
- [42] C. Pérez, C. V. Díaz-García, A. Aguiló-López, V. del Solar, S. Cabrera, M.T. Aguiló-Otero, C. Navarro-Ramírez, J. Alemán, J.A. López-Martín, *Evaluation of novel trans-sulfonamide platinum complexes against tumor cell lines*, *Eur. J. Med. Chem.* 76 (2014) 360–368, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.023>.
- [43] Z. Guo, Y. Xu, Y. Peng, Haroon ur Rashid, W. Qian, P. Xie, L. Wu, J. Jiang, L. Wang, X. Liu, *Design, synthesis and evaluation of novel (S)-tryptamine derivatives containing an allyl group and an aryl sulfonamide unit as anticancer agents*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 29 (2019) 1133–1137, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.02.023>.
- [44] D. Iwan, K. Kamińska, M. Denis-Bobrowicz, A.B. Olejczak, E. Wojcieszynska, *Chiral sulfonamides with various N-heterocyclic and aromatic units - Synthesis and antiviral activity evaluation*, *Biomol. Pharmacother.* 153 (2022) 113473, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113473>.
- [45] A.H. Shaifali, S. Khan, G. Tapadiya, A. Chettyapalli, S. Saboo, M.S. Shaifali, F. Siddiqui, R.R. Amara, *Rational drug design, synthesis, and biological evaluation of novel N-(2-arylaminoethyl)-2,3-diphenylquinazolin-6-sulfonamides as potential anticancer, antifungal, and antibacterial agents*, *Dig. Chin. Med.* 4 (2021) 290–304, <https://doi.org/10.1016/j.dcm.2021.12.004>.
- [46] B. Adny, P. Sola, F. Colak, M. Kaya, *Synthesis of novel sulfonamide analogs containing sulfonamide/sulfaguanidine and their biological activities*, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 31 (2016) 1005–1010, <https://doi.org/10.1080/14752875.2015.1079103>.
- [47] F.A. Nagia, R.S.R. El-Mohamedy, *Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from Fusarium oxysporum*, *Dyes and Pigments* 75 (2007) 550–555, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.07.002>.
- [48] B. Hans-Sanoel, S. Josef, W. Klaus, *Anthraquinone Dyes and Intermediates*, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (2000), <https://doi.org/10.1002/14356009.a01.3955>.
- [49] I. Grachev, T. Philipova, *Synthesis, spectral properties and application of some reactive anthraquinone dyes*, *Dyes Pigm.* 39 (1998) 80–95.
- [50] L. Dufosse, *Anthraquinones, the Diels-Jakob and Mc Hyde of the food pigment family*, *Food Res. Int.* 65 (2014) 132–126, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.032>.
- [51] T. Singh, V.K. Pandey, K.K. Dash, S. Zanwar, R. Singh, *Natural bio-colorant and pigments: Sources and applications in food processing*, *J. Agric. Food Res.* (2023) 100628, <https://doi.org/10.1016/j.jaf.2023.100628>.
- [52] D. Gauri, N. Kumar, Kaur, *Rigid anthraquinone based sensor for dual and differential colorimetric detection of Cu<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> ions: Mimicking different molecular logic systems*, *Results Chem.* 4 (2022) 100563, <https://doi.org/10.1016/j.rchem.2022.100563>.
- [53] N. Kaur, Gauri, *Anthraquinone appended chemosensors for fluorescence monitoring of anions and/or metal ions*, *Inorg. Chim. Acta* 536 (2022) 120017, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2022.120017>.
- [54] A. Wcislo, A. Ciolek, D. Zarzecka, P. Niedziółkowski, S. Nakoneczna, T. Osovski, *Polyether precursors of molecular recognition systems based on the 9,10-anthraquinone moiety*, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 137 (2015) 979–986, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.08.011>.
- [55] H. Yang, Z.-G. Zhou, J. Xu, F.-Y. Li, T. Yi, C.-H. Huang, *A highly selective ratiometric chemosensor for Hg<sup>2+</sup> based on the anthraquinone derivative with urea groups*, *Tetrahedron* 63 (2007) 6732–6736, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.04.086>.
- [56] S. Bześka, J. Bześka, P. Niedziółkowski, D. Zarzecka, *Macrocyclic chemosensors with anthraquinone signaling unit built into ionophore. Experimental and computational studies (part I) - synthesis and effect of proton binding on spectrofluorometric and electrochemical properties*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 292 (2023) 122405, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.122405>.
- [57] S. Romotowska, I. Dabkowska, D. Zarzecka, *In pursuit of the ideal chromoionophore (part II): The structure-property relationship for electrochemical signaling capacities of urea-12-crown-4 ether substituted with an anthraquinone moieties*, *Dyes Pigm.* 197 (2022) 109891, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109891>.
- [58] M. Shaaban Malik, R.I. Almarazi, R.S. Jazam, A.A. Alshamir, E. Syed, M. A. Alharaz, F. Kalgama, M. Merad, I.I. Althagafi, S.A. Ahmed, *Journal of anthraquinones as anticancer agents - a systematic review of recent literature*, *RSC Adv.* 11 (2021) 35806–35827, <https://doi.org/10.1039/D1RA06680G>.
- [59] A. Chylewska, A. Silarzka, M. Ogyzek, M. Makowski, *Attractive π-π and π-π interactions in the pyrazine 2-thiocarbonyl structure: Experimental and computational studies in the context of crystal engineering and microbiological properties*, *J. Mol. Struct.* 1105 (2016) 96–104, <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2015.10.092>.
- [60] J. Brasili, A. Gasielka, M. Mahowski, *Theoretical study on the alkylamino-substituted sulfonamides with potential biological activity*, *J. Phys. Chem. B* 127 (2023) 6620–6627, <https://doi.org/10.1021/jacs.3c01465>.
- [61] A.P. Krupcho, K.J. Shaw, *Synthesis and rearrangement of dihydro-1,4-oxazepine and dihydro-1,4-thiazepine derivatives*, *J. Org. Chem.* 48 (1983) 3341–3343, <https://doi.org/10.1021/jo00167a041>.
- [62] J.-D. Chai, M. Hand-Gordon, *Long-rungs corrected hybrid density functionals with charged atom-atom dispersion correction*, *Phys. Chem. Phys.* 10 (2008) 6615–6620, <https://doi.org/10.1039/b810109h>.
- [63] R. Krishnan, J.S. Blakley, R. Seeger, J.A. Pople, *Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions*, *J. Chem. Phys.* 72 (1980) 650–654, <https://doi.org/10.1063/1.438955>.
- [64] T. Clark, J. Chandrosshkar, G.W. Spitznagel, P.V.R. Schleyer, *Efficient diffuse function-augmented basis sets for anion calculations. III. The 3-21+G basis set for first-row elements, Li-F*, *J. Comput. Chem.* 4 (1983) 294–301, <https://doi.org/10.1002/jcc.540040303>.
- [65] A.V. Marenich, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, *Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions*, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 6378–6396, <https://doi.org/10.1021/jp810291n>.
- [66] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, Gaussian 16, Revision C.01, (2016).
- [67] T.J. Macke, D.A. Case, *Modeling Unusual Nucleic Acid Structures*, in: *Molecular Modeling of Nucleic Acids*, American Chemical Society, 1997, pp. 379–393, <https://doi.org/10.1021/bk-1998-0602.ch024>.
- [68] M. Zgarbová, J. Sponek, M. Otyepka, T.E.I. Cheatham, R. Galiado-Marillo, P. Jurečka, *Refinement of the sugar-phosphate backbone torsion beta for AMBER force fields improves the description of 2- and B-DNA*, *J. Chem. Theory Comput.* 11 (2015) 5723–5736, <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00716>.
- [69] D.A. Case, V. Babio, J. Berzeman, R.M. Betz, Q. Cai, D.S. Cerutti, T. Cheatham, T. Darden, R. Duke, H. Gohlke, A. Goz, S. Guazzo, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kasai, I. Kolossvary, A. Kovalevko, T.-S. Lee, P.A. Kollman, AMBER 14, University of California, San Francisco, 2014. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17892.37766>.
- [70] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A. J. Olson, *AutoDock4 and AutoDockTools: Automated docking with selective receptor flexibility*, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791, <https://doi.org/10.1002/jcc.21266>.
- [71] J. Gasteiger, M. Marsili, *Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges*, *Tetrahedron* 36 (1980) 3219–3228, [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(80\)00198-2](https://doi.org/10.1016/0040-4039(80)00198-2).
- [72] M.E. Reichmann, S.A. Rice, C.A. Thomas, P. Doty, *A further examination of the molecular weight and size of deoxyribose nucleic acid*, *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 3047–3053, <https://doi.org/10.1021/ja61640a067>.
- [73] A.C. Finlay, F.A. Hochstein, E.A. Sobin, P.X. Murphy, *Netropsin, a new antibiotic produced by a streptomyces*, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 341–343, <https://doi.org/10.1021/ja01143a115>.
- [74] R.M. Wartell, J.E. Larson, R.D. Wells, *Netropsin: a specific probe for A-T regions of duplex deoxyribonucleic acid*, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 6719–6731, <https://doi.org/10.1016/j.yjbc.1974.11.034>.
- [75] S.B. Singh, P.A. Kollman, *Calculating the Absolute Free Energy of Association of Netropsin and DNA*, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 3267–3271, <https://doi.org/10.1021/ja983118c>.
- [76] D.S. Goodsell, M.L. Kephau, R.E. Dickerson, *Refinement of netropsin bound to DNA: bias and feedback in electron density map interpretation*, *Biochemistry* 34 (1995) 4993–4993, <https://doi.org/10.1021/bi00015a009>.
- [77] J. Luk, G. Vamvar, *Binding of distamycin A and netropsin to the 12mer DNA duplexes containing mixed AT/CG sequences with at most five or three successive AT base pairs*, *Biochemistry* 39 (2000) 9317–9326, <https://doi.org/10.1021/bi000749n>.
- [78] J. Dolenc, R. Baron, C. Dostaler, J. Kollec, W.F. van Gunsteren, *Configurational entropy change of netropsin and distamycin upon DNA minor-groove binding*, *Biophys. J.* 91 (2006) 1460–1470, <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.074017>.
- [79] L.A. Mirloy, K.J. Breslauer, *Origins of netropsin binding affinity and specificity: correlations of thermodynamic and structural data*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (1987) 4359–4363, <https://doi.org/10.1073/pnas.84.13.4359>.
- [80] S. Romotowska, J. Bześka, P. Samczyński, M. Makowski, A. Chylewska, *Physicochemical and electrochemical characteristics of pyrazine-2-thiocarbonyl amide and its interaction ability against biomolecules*, *Electrochim. Acta* 304 (2021) 139150, <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.139150>.
- [81] A. Cienkiewicz, M. Gawronska, M. Makowski, S. Romotowska, *Sulfonamides differing in the alkylamino substituent length - Synthesis, electrochemical characteristics,*

A. Ciesielska et al.

acid-base profile and complexation properties, *Polyhedron* 221 (2022) 115868, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.115868>.

- [82] M.F. Alam, S. Vankhede, M.A. Khan, A.A. Laskar, H. Younus, In vitro DNA binding studies of therapeutic and prophylactic drug citral, *Int. J. Biol. Macromol.* 113 (2018) 300–308, <https://doi.org/10.1016/j.ijbmac.2018.02.028>.

*Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 316 (2024) 124513

- [83] H.A. Benati, J.H. Hildebrand, A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons, *J. Am. Chem. Soc.* 71 (1949) 2703–2707, <https://doi.org/10.1021/ja01176a030>.

## **Oświadczenia współautorów**



Gdańsk, dnia 20.06.24

mgr Aleksandra Ciesielska  
Katedra Chemii Bionieorganicznej  
Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu następujących artykułów naukowych:

1. Ramotowska, S.; **Ciesielska, A.**; Makowski, M. What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions? *Molecules* **2021**, 26, 3478, doi:10.3390/molecules26113478.
2. **Ciesielska, A.**; Gawrońska, M.; Makowski, M.; Ramotowska, S. Sulfonamides Differing in the Alkylamino Substituent Length – Synthesis, Electrochemical Characteristic, Acid-Base Profile and Complexation Properties. *Polyhedron* **2022**, 221, 115868, doi:10.1016/j.poly.2022.115868.
3. Ramotowska, S.; Spisz, P.; Brzeski, J.; **Ciesielska, A.**; Makowski, M. Application of the SwitchSense Technique for the Study of Small Molecules' (Ethidium Bromide and Selected Sulfonamide Derivatives) Affinity to DNA in Real Time. *J. Phys. Chem. B* **2022**, 126, 7238–7251, doi:10.1021/acs.jpcc.2c03138.
4. Brzeski, J.; **Ciesielska, A.**; Makowski, M. Theoretical Study on the Alkylamino-Substituted Sulfonamides with Potential Biological Activity. *J. Phys. Chem. B* **2023**, 127, 30, 6620–6627, doi:10.1021/acs.jpcc.3c01965.
5. **Ciesielska, A.**; Brzeski, J.; Zarzeczkańska, D.; Stasiuk, M.; Makowski, M.; Brzeska, S. Exploring the interaction of biologically active compounds with DNA using the SwitchSense technique, UV-Vis spectroscopy, and computational methods. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2024**, 124313, doi:10.1016/j.saa.2024.124313.

wchodzących w skład mojej rozprawy doktorskiej obejmował:

**Ad. 1.** Wykonanie przeglądu literaturowego oraz opracowanie rysunków i tabel. Przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu oraz dopracowanie artykułu do publikacji.



**Ad. 2.** Przeprowadzenie syntez pochodnych sulfonamidowych oraz analiz ich profili elektrochemicznych, właściwości kwasowo-zasadowych oraz właściwości kompleksotwórczych z jonami Ru(III) i Rh(III). Opracowanie uzyskanych wyników, rysunków i tabel. Przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu oraz dopracowanie artykułu do publikacji.

**Ad. 3.** Wyznaczenie parametrów kinetycznych dla oddziaływania dwóch pochodnych sulfonamidowych (NethylS, NpropylS) z helisą DNA przy pomocy techniki switchSENSE. Opracowanie uzyskanych wyników, rysunków i tabel. Przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu oraz dopracowanie artykułu do publikacji.

**Ad. 4.** Wykonanie syntezy pochodnej sulfonamidowej NbutylS, a następnie charakterystyki strukturalnej oraz analizy właściwości kwasowo-zasadowych, w tym wyznaczenie wartości  $pK_a$ . Opracowanie uzyskanych wyników, rysunków i tabel. Przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu.

**Ad. 5.** Wyznaczenie parametrów kinetycznych dla oddziaływania związku NbutylS oraz PTCA z helisą DNA przy pomocy techniki switchSENSE. Opracowanie uzyskanych wyników, rysunków i tabel. Przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu oraz dopracowanie artykułu do publikacji.

*Aleksandra Ciosek*

Podpis



Gdańsk, dnia 21.06.2024

prof. dr hab. Mariusz Makowski  
Katedra Chemii Bionieorganicznej  
Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

#### Oświadczenie współautora

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu następujących artykułów naukowych:

1. Ramotowska, S.; Ciesielska, A.; **Makowski, M.** What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions? *Molecules* **2021**, 26, 3478, doi:10.3390/molecules26113478.
2. Ciesielska, A.; Gawrońska, M.; **Makowski, M.**; Ramotowska, S. Sulfonamides Differing in the Alkylamino Substituent Length – Synthesis, Electrochemical Characteristic, Acid-Base Profile and Complexation Properties. *Polyhedron* **2022**, 221, 115868, doi:10.1016/j.poly.2022.115868.
3. Ramotowska, S.; Spisz, P.; Brzeski, J.; Ciesielska, A.; **Makowski, M.** Application of the SwitchSense Technique for the Study of Small Molecules' (Ethidium Bromide and Selected Sulfonamide Derivatives) Affinity to DNA in Real Time. *J. Phys. Chem. B* **2022**, 126, 7238–7251, doi:10.1021/acs.jpcc.2c03138.
4. Brzeski, J.; Ciesielska, A.; **Makowski, M.** Theoretical Study on the Alkylamino-Substituted Sulfonamides with Potential Biological Activity. *J. Phys. Chem. B* **2023**, 127, 30, 6620–6627, doi:10.1021/acs.jpcc.3c01965.
5. Ciesielska, A.; Brzeski, J.; Zarzecznańska, D.; Stasiuk, M.; **Makowski, M.**; Brzeska, S. Exploring the interaction of biologically active compounds with DNA using the SwitchSense technique, UV-Vis spectroscopy, and computational methods. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2024**, 124313, doi:10.1016/j.saa.2024.124313.

wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Ciesielskiej obejmował:

**Ad. 1. – Ad. 5.** Opiekę merytoryczną nad realizowanymi badaniami oraz współudział w opracowywaniu koncepcji prac i dyskusji wyników. Zapewnienie finansowania badań w pracach





1-4. Korekty pierwotnych wersji manuskryptu oraz dopracowanie artykułu do publikacji. Pełnienie roli autora korespondującego.

KIEROWNIK  
Zakładu Chemii i Biochemii  
*Małgorzata Malinowska*  
mgr inż. Małgorzata Malinowska

.....  
Podpis



Gdańsk, dnia 10.07.2024

dr Sandra Brzeska  
Katedra Chemii Bionieorganicznej  
Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

### Oświadczenie współautora

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu następujących artykułów naukowych:

1. **Ramotowska, S.**; Ciesielska, A.; Makowski, M. What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions? *Molecules* **2021**, 26, 3478, doi:10.3390/molecules26113478.
2. Ciesielska, A.; Gawrońska, M.; Makowski, M.; **Ramotowska, S.** Sulfonamides Differing in the Alkylamino Substituent Length – Synthesis, Electrochemical Characteristic, Acid-Base Profile and Complexation Properties. *Polyhedron* **2022**, 221, 115868, doi:10.1016/j.poly.2022.115868.
3. **Ramotowska, S.**; Spisz, P.; Brzeski, J.; Ciesielska, A.; Makowski, M. Application of the SwitchSense Technique for the Study of Small Molecules' (Ethidium Bromide and Selected Sulfonamide Derivatives) Affinity to DNA in Real Time. *J. Phys. Chem. B* **2022**, 126, 7238–7251, doi:10.1021/acs.jpcc.2c03138.
4. Ciesielska, A.; Brzeski, J.; Zarzecznańska, D.; Stasiuk, M.; Makowski, M.; **Brzeska, S.** Exploring the interaction of biologically active compounds with DNA using the SwitchSense technique, UV-Vis spectroscopy, and computational methods. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2024**, 124313, doi:10.1016/j.saa.2024.124313.

wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Ciesielskiej obejmował:

- Ad. 1.** Koncepcja pracy, wykonanie przeglądu literaturowego oraz opracowanie rysunków i tabel. Przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu oraz dopracowanie artykułu do publikacji.
- Ad. 2.** Opieka merytoryczna, przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu oraz dopracowanie artykułu do publikacji.



**Ad. 3.** Określenie problemu badawczego, koncepcja części eksperymentu oraz wyznaczenie parametrów kinetycznych dla oddziaływania bromku etydyny z helisą DNA przy pomocy techniki switchSENSE. Opracowanie uzyskanych wyników, rysunków i tabel. Przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu oraz dopracowanie artykułu do publikacji.

**Ad. 4.** Koncepcja pracy, wyznaczenie parametrów kinetycznych dla oddziaływania związku AQ-NetOH oraz netropsyny z helisą DNA przy pomocy techniki switchSENSE. Opracowanie uzyskanych wyników, rysunków i tabel. Zapewnienie finansowania badań. Przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu oraz dopracowanie artykułu do publikacji.

*Sandra Brozka*  
.....  
Podpis



Gdańsk, dnia 12.01.2024

dr Jakub Brzeski  
Katedra Chemii Bionieorganicznej  
Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

### Oświadczenie współautora

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu następujących artykułów naukowych:

1. Ramotowska, S.; Spisz, P.; **Brzeski, J.**; Ciesielska, A.; Makowski, M. Application of the SwitchSense Technique for the Study of Small Molecules' (Ethidium Bromide and Selected Sulfonamide Derivatives) Affinity to DNA in Real Time. *J. Phys. Chem. B* **2022**, 126, 7238–7251, doi:10.1021/acs.jpcc.2c03138.
2. **Brzeski, J.**; Ciesielska, A.; Makowski, M. Theoretical Study on the Alkylamino-Substituted Sulfonamides with Potential Biological Activity. *J. Phys. Chem. B* **2023**, 127, 30, 6620–6627, doi:10.1021/acs.jpcc.3c01965.
3. Ciesielska, A.; **Brzeski, J.**; Zarzeczńska, D.; Stasiuk, M.; Makowski, M.; Brzeska, S. Exploring the interaction of biologically active compounds with DNA using the SwitchSense technique, UV-Vis spectroscopy, and computational methods. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2024**, 124313, doi:10.1016/j.saa.2024.124313.

wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Ciesielskiej obejmował:

Wykonanie wszystkich obliczeń teoretycznych oraz dokowania molekularnego. Opracowanie uzyskanych wyników, rysunków i tabel oraz przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptów. Ponadto w przypadku publikacji nr 2 wkład obejmował również określenie problemu badawczego, koncepcję w części prowadzonego eksperymentu oraz dopracowanie artykułu do publikacji.

  
.....  
Podpis



Gdańsk, dnia 21.06.2024

dr Dorota Zarzeckańska  
Katedra Chemii Analitycznej  
Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

#### Oświadczenie współautora

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu następującego artykułu naukowego:

1. Ciesielska, A.; Brzeski, J.; **Zarzeckańska, D.**; Stasiuk, M.; Makowski, M.; Brzeska, S.  
Exploring the interaction of biologically active compounds with DNA using the SwitchSense technique, UV-Vis spectroscopy, and computational methods. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2024**, 124313, doi:10.1016/j.saa.2024.124313.

wchodzącego w skład rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Ciesielskiej obejmował:

Wykonanie analizy oddziaływania związku AQ-NetOH z biomolekułą DNA przy użyciu miareczkowania spektrofotometrycznego. Opracowanie otrzymanych wyników, sporządzenie rysunków oraz przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu.

.....  
Zarzeckańska  
.....  
Podpis



Gdańsk, dnia 24.06.2024

Magdalena Stasiuk  
Katedra Chemii Bionieorganicznej  
Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

#### Oświadczenie współautora

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu następującego artykułu naukowego:

1. Ciesielska, A.; Brzeski, J.; Zarzeczkańska, D.; **Stasiuk, M.**; Makowski, M.; Brzeska, S. Exploring the interaction of biologically active compounds with DNA using the SwitchSense technique, UV-Vis spectroscopy, and computational methods. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2024**, 124313, doi:10.1016/j.saa.2024.124313.

wchodzącego w skład rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Ciesielskiej obejmował:

Asysta przy wykonaniu badania oddziaływań związku NbutylS oraz PTCA z helisą DNA przy użyciu techniki switchSENSE.

  
.....  
Podpis



UNIwersYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU  
Wydział Nauk Biologicznych  
i Weterynaryjnych

Toruń, 26.06.2024

Dr inż. Paulina Spisz  
Katedra Immunologii  
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych  
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

#### Oświadczenie współautora

Oświadczam, że mój udział w przygotowaniu następującego artykułu naukowego:

1. Ramotowska, S.; **Spisz, P.**; Brzeski, J.; Ciesielska, A.; Makowski, M. Application of the SwitchSense Technique for the Study of Small Molecules' (Ethidium Bromide and Selected Sulfonamide Derivatives) Affinity to DNA in Real Time. *J. Phys. Chem. B* **2022**, 126, 7238–7251, doi:10.1021/acs.jpch.2c03138.

wchodzącego w skład rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Ciesielskiej obejmował:

Określenie problemu badawczego i częściowej koncepcji oraz wyznaczenie parametrów kinetycznych dla oddziaływania sulfatiazolu z helisą DNA przy pomocy techniki switchSENSE. Opracowanie uzyskanych wyników, rysunków i tabel. Przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu oraz dopracowanie artykułu do publikacji.

Podpis

Gdańsk, dnia 20.06.2024

#### Oświadczenie współautora

Ja, dr inż. Małgorzata Gawrońska, oświadczam, że mój udział w przygotowaniu następującego artykułu naukowego:

1. Ciesielska, A.; **Gawrońska, M.**; Makowski, M.; Ramotowska, S. Sulfonamides Differing in the Alkylamino Substituent Length – Synthesis, Electrochemical Characteristic, Acid-Base Profile and Complexation Properties. *Polyhedron* **2022**, 221, 115868, doi:10.1016/j.poly.2022.115868.

wchodzącego w skład rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Ciesielskiej obejmował:

syntezę pochodnych sulfonamidowych (NethylS i NpropylS) oraz zlecenie Sekcji Pomiarów Fizykochemicznych Wydziału Chemii UG potwierdzenia ich struktury metodami NMR, MS i analizy elementarnej. Przygotowanie uzyskanych wyników w postaci rysunków i tabel oraz napisanie części pierwotnej wersji manuskryptu w zakresie przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów.

Małgorzata Gawrońska

Podpis